



Prss56Cre, un nouvel outil pour l'étude de la neurogenèse adulte chez la souris

Alexandre Jourdon

► To cite this version:

Alexandre Jourdon. Prss56Cre, un nouvel outil pour l'étude de la neurogenèse adulte chez la souris. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066082 . tel-01163627

HAL Id: tel-01163627

<https://theses.hal.science/tel-01163627>

Submitted on 15 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

Ecole Doctorale Complexité du vivant (ED515)

Spécialité Neurobiologie

Présentée par

Alexandre Jourdon

Prss56^{Cre}, un nouvel outil pour l'étude de la neurogenèse
adulte chez la souris

Soutenue publiquement le 15 avril 2015

Devant un jury composé de :

Pr Ann Lohof

Dr Harold Cremer

Dr Olivier Raineteau

Dr Isabelle Caillé

Dr Piotr Topilko

Pr Patrick Charnay

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Directeur de l'équipe

Abstract

The *Prss56* gene encodes a serine protease involved in eye pathologies and development in humans. *Prss56* expression pattern and function in the rest of the central nervous system were however unknown. Here, I used a knock-in allele in the mouse, *Prss56^{Cre}*, carrying a Cre recombinase insertion in the locus, to establish the pattern of expression of the gene and to trace the derivatives of *Prss56*-expressing cells. I found that, in the adult mouse, *Prss56* is specifically expressed in three neurogenic niches: the dentate gyrus (DG), the subventricular zone (SVZ) and the hypothalamus ventricular zone (HVZ). In the prospective DG, *Prss56* is expressed during embryogenesis in a subpopulation of radial glia. Consistently, the pattern of migration and differentiation of traced cells during development recapitulates the successive steps of DG neurogenesis, including the formation of a subpopulation of adult neural stem cells (aNSC). In the SVZ, *Prss56* is expressed after birth in a subpopulation of aNSC mainly localized in the medial-ventral region of the lateral wall. This subpopulation preferentially gives rise to deep granule and calbindin-positive periglomerular cells in the olfactory bulb. Finally, *Prss56* is also expressed in a subpopulation of alpha2-tanycytes, potential aNSC of the adult HVZ. My observations reveal that some traced tanycytes translocate their soma into the parenchyma and might give rise to a novel cell type in this territory. In conclusion, this study establishes the *Prss56^{Cre}* line as a novel and efficient tool to study various aspects of adult neurogenesis in the mouse.

Résumé

Le gène *Prss56* code pour une sérine protéase impliquée dans le développement de l'œil humain et certaines de ses pathologies. Le patron d'expression et la fonction de *Prss56* dans le reste du système nerveux central sont cependant inconnus. Dans cette étude, j'utilise l'allèle murin *Prss56^{Cre}*, comportant l'insertion de la recombinase Cre au sein du locus, pour établir le patron d'expression de ce gène et tracer le devenir des cellules exprimant *Prss56*. Je montre que *Prss56* est spécifiquement exprimé dans trois niches neurogéniques : le gyrus dentelé (GD), la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone ventriculaire de l'hypothalamus (ZVH). Dans le GD embryonnaire, *Prss56* est exprimé par une sous-population de glie radiaire. La migration et la différenciation des cellules tracées récapitulent les étapes successives de la neurogenèse du GD et l'établissement d'une sous-population de cellules souches neurales adultes (CSNa). Dans la SVZ, *Prss56* est exprimé après la naissance dans une sous-population de CSNa principalement localisée dans la partie médio-ventrale du mur latéral. Cette sous-population génère préférentiellement des cellules granulaires profondes et des cellules périglomérulaires Calbindin-positives du bulbe olfactif. Enfin, *Prss56* est exprimé par une sous-population de tanycytes alpha-2, les potentielles cellules souches de la ZVH adulte. Je montre que certains tanycytes tracés déplacent leur soma vers le parenchyme et pourraient être à l'origine d'un nouveau type cellulaire de ce territoire. A travers ces diverses observations, ce travail établit que la lignée *Prss56^{Cre}* constitue un outil idéal pour l'étude de nombreux aspects de la neurogenèse adulte.

« Je suis toujours prêt à apprendre, bien que je n'aime pas toujours qu'on me donne des leçons »
Churchill

« La vraie Science est une ignorance qui se sait »
Montaigne

« Une journée sans rire est une journée perdue »
Chaplin

« Au début de ma thèse j'étais encore un peu prétentieux, cette année je suis parfait »
(dérivée de) Frédéric Dard

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux membres du jury, les docteurs Harold Cremer et Olivier Raineteau, qui ont tous deux accepté d'évaluer ce manuscrit, le professeur Ann Lohof et le docteur Isabelle Caillé, qui me permettent de défendre et de valoriser ce travail lors de ma soutenance de thèse.

La rédaction de ce mémoire marque l'achèvement apothéotique de quatre années de recherche à l'institut de biologie de l'Ecole Normale Supérieure. Ce fut une expérience passionnante, enrichissante à différents niveaux et dont personne ne sort indemne, ni inchangé.

Je n'aurais pu souhaiter pour cette expérience meilleur directeur d'équipe que Patrick. Je te remercie de m'avoir accueilli et supporté (double langage ?) au cours de ces années. Tu m'as beaucoup appris par ta grande sagacité, ta plume aiguisée, l'étendue de ta culture et ton humour impérissable. Je regrette (un peu) de m'être éloigné de *Krox20*, si cher à ton laboratoire. Tu as pourtant accepté avec entrain ma bifurcation exploratoire vers les cellules souches neurales adultes et l'étude de ce gène au nom si imprononçable, *Prss56* (impossible de nommer un bateau après cela...).

Pour cette exploration en territoire inconnu, l'inspiration et la curiosité motrice de Piotr ont été indispensables. Il a surtout accepté de me diriger à travers cette thèse (preuve d'un goût du risque prononcé) et j'ai toujours pu bénéficier de ton optimisme inébranlable et de ton ingéniosité débordante. J'espère que tu as apprécié ce voyage autant que moi.

Cette thèse doit également beaucoup à l'énergie et à la pugnacité de Renata. Nos quelques soucis de traduction (phase dite *d'échauffement*) ont laissé place à une collaboration des plus amusantes et formatrices. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours voulu tirer le meilleur de ce projet et d'avoir continué à y contribuer même depuis les antipodes.

En complément de ces tuteurs – aux qualités fortuitement complémentaires – ma vie au laboratoire s'est nourrie de nombreuses interactions sources de la bonne humeur et de l'émulsion nécessaires à toute avancée scientifique (ajoutez quand même une machine à café à la recette). J'aimerais adresser quelques lignes aux personnalités qui ont marqué cet épisode d'une empreinte indélébile. Merci à vous *tous*, qui avez supporté ma néoténie, mes jeux de mots indéliques et ma volonté irrévérencieuse de mener les débats vers l'improbable :

La *Piotr-Team* : A Aurélie G., sur qui j'ai toujours pu compter (sauf pour les CF) et qui a eu le charme pour fournir à la fois la réflexion, les coups de fouet, et l'aide nécessaires à mon évolution. A Fanny, pour ta gentillesse et l'impressionnante étendue de ton savoir technique ; j'espère qu'ils t'ouvriront le passage vers les *sphères* les plus prolifiques de la vie.

Spéciale dédicace à Carole, co-box de ces quatre années, qui a été, souvent malgré elle, l'oreille de mes délires et de mes goûts musicaux douteux, ainsi que la source inépuisable de discussions et d'informations salvatrices.

Dans la catégorie meilleur espoir scientifique féministe, je dois beaucoup à Elodie qui a eu la gentillesse d'accueillir mes élucubrations lors de mes (très rares) déambulations dans la pièce voisine. Je te remercie pour ton empathie, ton sens critique aiguisé (surtout pour les pics), et ton esprit suffisamment lumineux pour broyer du noir avec le sourire (*paradoxe*).

A Pascale, pour son surprenant mélange de conseils avisés et de fantaisies imprévisibles. A Graziella, pour sa sympathie et sa curiosité. Aurélie J., dont le placement stratégique à la machine à café a rendu la compagnie incontournable, mérite un remerciement particulier pour avoir supporté ma malice et mon arthrose avec le sourire. Pour compléter ce tableau bariolé, je mentionnerai la curiosité implacable de Yassine, le charme d'érable de Patricia, la gentillesse de Charlotte et l'énergie de Johan, dont les départs progressifs ont rythmé l'évolution de la vie de notre équipe. Les simples qualités que je leur accole ne suffisent pas à résumer leurs contributions au cours de ces années. Ils ont heureusement été remplacés récemment par Patrick T. (ophiophile), puis Katarzyna (estivale), qui apportent, chacun à leur manière, la relève de bonne humeur, de présence tardive et de fantaisie que je craignais voir disparaître avec mon départ (*instant modestie*).

Je change de couloir pour remercier l'équipe dont la présence assure le maintien de l'ambiance savoureuse du 1^{er} étage à travers les années. D'eux, je ne citerai que le rire salubre de Florence, le piquant de Marina, le regard amusé d'Aline, le rire explosif de Julien, l'intelligence flegmatique de Nicolas, l'espièglerie de Sylvain, le dilettantisme rassurant de FX et Guillaume, la présence dominicale de Marika, la discrétion de Brigitte et bien sûr les macarons de Frédérique. Chacun mériterait un paragraphe... voire, une thèse dédiée.

Le bon déroulement de ma thèse a été rendu possible par la diligence et le soutien logistique de Solange et Rouben qui, chacun avec leur style particulier, ont su composer avec mon absence totale de sens administratif.

Un remerciement particulier aux membres de l'animalerie souris de l'IBENS, notamment Abder, Amandine et Christophe, qui malgré ma présence sporadique ont assuré la survie des lignées murines indispensables à mes travaux. Un grand merci également à Lucia qui anime l'animalerie de quarantaine avec une efficacité et un exotisme tout particulier.

Je grimpe de quelques étages pour mentionner les équipes des sections Neurosciences et Développement qui m'ont chacune apporté une aide précieuse, fût-ce par un protocole, un conseil, un équipement ou tout simplement un aliquot inespéré. J'aimerais tout particulièrement remercier Nathalie Spassky dont les conseils techniques et scientifiques sur l'étude de la neurogenèse adulte ont été essentiels à la réalisation de ce projet.

Les images vous paraîtront sublimes (ai-je mentionné ma modestie ?) : c'est essentiellement grâce à notre plateforme de Microscopie et à l'assistance, quasiment 7j/7, sauf aux *heures heureuses*, de Benjamin et Astou ; ce malgré ma tendance à faire surchauffer leurs lasers.

Je quitte enfin le laboratoire (dans ce texte seulement, dans les faits cela risque de prendre plus de temps) pour saluer mes amis, dont la chaleureuse remise en question permanente de mon choix de carrière m'a convaincu de continuer inlassablement vers cette voie. Merci de m'avoir permis de garder l'équilibre.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille pour son soutien inconditionnel au cours des années et pour sa curiosité ingénue mais essentielle. **Merci.**

Sommaire

INTRODUCTION	11
1 Organisation, développement et plasticité du système nerveux.....	14
1.1 Des cellules souches	
1.2 Le système nerveux des vertébrés	
1.2.1 Organisation anatomique	
1.2.2 Principaux types cellulaires du système nerveux adulte	
1.2.3 Développement du système nerveux	
1.2.4 La neurogenèse embryonnaire	
1.3 Plasticité du système nerveux et découverte de la neurogenèse adulte	
2 La neurogenèse de l'hippocampe.....	30
2.1 Organisation et fonctions du gyrus dentelé de l'hippocampe	
2.2 Développement du gyrus dentelé et mise en place de la niche neurogénique adulte	
2.2.1 Spécification du gyrus dentelé par le cortical hem	
2.2.2 Neurogenèse du gyrus dentelé embryonnaire	
2.2.3 Facteurs de transcription impliqués	
2.2.4 Les glies radiaires : échafaudage glial à l'origine des cellules souches adultes ?	
2.3 La neurogenèse adulte du gyrus dentelé	
2.3.1 Etapes cellulaires	
2.3.2 Quelques éléments sur la régulation de la neurogenèse adulte	
2.4 Fonctions de la neurogenèse adulte	
2.5 Neurogenèse de l'hippocampe adulte chez l'Homme	
3 La neurogenèse adulte de la zone sous-ventriculaire murine	44
3.1 Etapes cellulaires, de la zone-sousventriculaire jusqu'au bulbe olfactif	
3.2 Caractéristiques des cellules souches de type B1	
3.3 Régulations de la neurogenèse au sein de la niche sous-ventriculaire	
3.3.1 Interface ventriculaire et influence du liquide cébrospinal	
3.3.2 Interface intermédiaire et influence des neurotransmetteurs	
3.3.3 Interface basale et influence du système vasculaire	
3.4 Diversité des neurones générés au niveau du bulbe olfactif	
3.5 Liens entre origine, régionalisation et potentiels des cellules souches de la SVZ adulte	
3.6 Rôles physiologiques de la neurogenèse du bulbe olfactif	
3.7 Présence d'une neurogenèse d'origine sous-ventriculaire chez l'Homme ?	
4 L'hypothalamus, une troisième niche neurogénique ?	58
4.1 Fonctions, développement et organisation de l'hypothalamus	
4.2 Les tanocytes : diversité et fonctions	

4.3	Démonstration de la présence de cellules souches et de neurogenèse dans l'hypothalamus	
4.4	Différentes cellules progénitrices ?	
4.4.1	Tanocytes β	
4.4.2	Tanocytes α	
4.4.3	Autres précurseurs neurogéniques	
4.5	Neurogenèse adulte de l'hypothalamus : implications dans le contrôle du métabolisme	
4.5.1	Modification des circuits neuronaux de la balance énergétique	
4.5.2	Régénération de populations neuronales soumises à une dégénérescence	
4.5.3	Implications dans les désordres alimentaires et le vieillissement	
5	Implication des cellules des capsules frontières dans le développement du système nerveux périphérique	71
	RESULTATS	75
	Partie 1 : <i>Prss56, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain</i>	79
	Partie 2 : Données additionnelles.....	117
	DISCUSSION	121
1	<i>Prss56</i>, <i>Prss56^{Cre}</i> et les niches neurogéniques adultes	124
1.1	Le gène <i>Prss56</i> n'est-il exprimé que par des cellules souches ?	
1.2	Quelle est la particularité des cellules qui expriment <i>Prss56</i> ?	
1.3	Quels facteurs sont susceptibles d'intervenir dans la régulation du gène <i>Prss56</i> ?	
1.4	Une fonction pour la protéine Prss56 ?	
2	Evolutions de la neurogenèse et de la gliogenèse durant la formation du GD	128
3	Que révèlent l'apparition et le devenir des cellules tracées dans la SVZ ?.....	131
4	De nouveaux neurones s'intègrent-ils dans la RMS, la SVZ et le striatum ?	132
5	Les tanocytes tracés sont-ils des cellules souches neurales de l'hypothalamus ?	133
6	Quelques mots sur les cellules engainantes du bulbe olfactif.....	135
7	Remarques sur l'utilisation des lignées rapportrices.....	137
8	<i>Prss56^{Cre}</i> : un nouvel outil d'étude de la neurogenèse adulte ?	139
	ANNEXES <i>Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin</i>	141
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189

INTRODUCTION

Les travaux présentés au cours de ce mémoire de thèse décrivent un nouvel outil d'étude de la neurogenèse adulte chez la souris, l'allèle *Prss56^{Cre}*. Ces travaux s'intègrent dans le vaste champ disciplinaire de la neurobiologie englobant le développement et la plasticité du système nerveux. J'ai réalisé cette étude dans le laboratoire de Patrick Charnay, sous la direction de Piotr Topilko, à l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), entre 2011 et 2015.

Pour introduire cette étude, je présente au cours de cette introduction une synthèse des connaissances sur le fonctionnement des cellules souches neurales et de la neurogenèse adulte, avec une attention plus soutenue sur certains mécanismes qui m'ont particulièrement intéressé au cours de ces quatre années.

J'ouvre sur quelques généralités présentant les notions de cellules souches, de niches neurogéniques et de plasticité. Mes observations m'ayant conduit à l'étude de parties anatomiques très variées du système nerveux embryonnaire et adulte, je me permets de rappeler brièvement l'organisation et le développement de celui-ci. La deuxième partie de l'introduction explore la mise en place et l'organisation de la niche de cellules souches de l'hippocampe adulte. La partie suivante décrit les mécanismes qui gouvernent la neurogenèse adulte au niveau de la zone sous-ventriculaire et met en exergue l'hétérogénéité des cellules souches de cette niche. La quatrième partie est dédiée aux travaux démontrant l'existence d'un troisième site de neurogenèse adulte à la base de l'hypothalamus et explore son rôle dans le contrôle du métabolisme.

Je termine par une parenthèse sur des cellules particulières du système nerveux périphérique appelées cellules des capsules frontières. Ces cellules sont étrangement à l'origine des travaux que j'ai réalisés durant ma thèse sur la neurogenèse adulte. Cette dernière partie illustrera parfaitement la *sérendipité* * essentielle à toute recherche scientifique.

J'espère, cher lecteur, que cette introduction vous permettra de mettre à jour vos connaissances sur ce passionnant domaine des cellules souches neurales, piquera votre curiosité sur certains aspects et vous permettra de mieux apprécier mes travaux. J'espère que vous y trouverez plus que vous ne vous y attendiez.

* J'utilise au cours de ce texte *l'italique* pour indiquer les termes et expressions consacrés (ou difficile à traduire), les mots en langues étrangères (anglais, latin et grec) et, comme il est d'usage, le nom des gènes et des allèles murins. Je garde l'usage du **gras** pour les mots clés incontournables.

1 Organisation, développement et plasticité du système nerveux

1.1 Des cellules souches

L'étude du développement des organismes pluricellulaires soulève une simple question : comment se forme un individu complexe à partir d'une seule cellule ? Plusieurs mécanismes cellulaires fondamentaux permettent de répondre à cette question (Figure 1) :

- la **prolifération** cellulaire, responsable de l'augmentation continue du nombre de cellules et de la taille de l'embryon ;
- la **régionalisation** des cellules en domaines distincts, qui structure les tissus et l'organisme selon un schéma stéréotypé ;
- enfin, la **différenciation** cellulaire, qui oriente progressivement chaque cellule vers une destinée particulière.

La séquence de ces mécanismes, finement régulée dans chacune des cellules de l'organisme, permet d'obtenir les tissus primitifs constituant la base des organismes vertébrés, au cours des premières phases du développement (p. ex. ectoderme, endoderme et mésoderme à la fin de la gastrulation). Cependant, pour former des tissus fonctionnels, une grande partie des cellules perdent leur capacité à se diviser pour remplir des fonctions spécialisées (p. ex. communication, respiration, métabolisme, etc.). Pour continuer leur formation, les tissus conservent des cellules immatures, appelées **cellules souches** somatiques, qui sont responsables de l'apport constant de cellules spécialisées nécessaire à l'achèvement du développement de l'organisme, puis au maintien de son intégrité à l'âge adulte (Figure 1).

Par définition, une cellule souche est une cellule capable de se maintenir dans un tissu et de générer l'ensemble ou une partie des cellules constituant ce tissu. Pour assurer ces propriétés, les cellules souches effectuent deux types de division cellulaire : la division *symétrique* qui permet de générer deux cellules identiques et la division *asymétrique* qui permet de générer une cellule spécialisée, tout en maintenant la cellule d'origine dans le tissu (Figure 1).

D'abord présentes dans tous les tissus durant le développement, le nombre de cellules souches diminue à la fin de l'embryogenèse et du développement postnatal pour ne se maintenir que dans quelques structures particulières chez l'adulte. La surprenante capacité de ces cellules souches postnatales et adultes à se maintenir indifférenciées dans un tissu en différenciation, puis différencié, nécessite la présence de signaux inhibant le processus général de différenciation. Pour ce faire, les tissus forment des structures cellulaires et

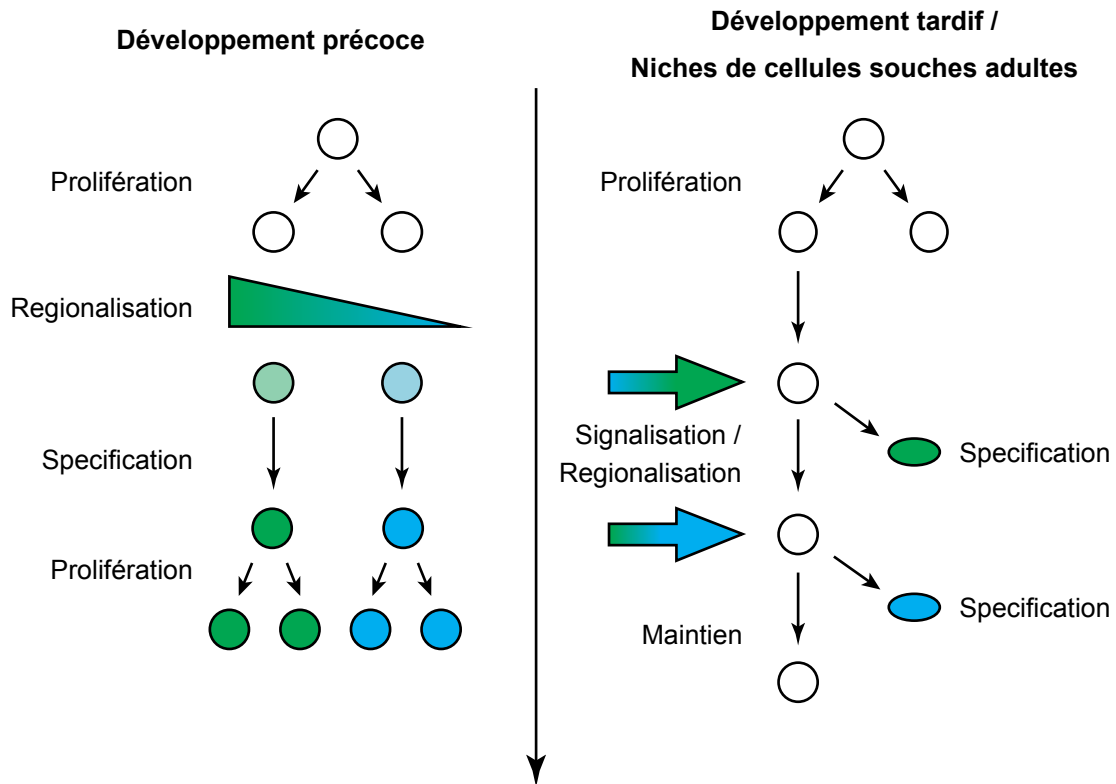


Figure 1 Cellules souches et division asymétrique.

Durant le développement précoce, les premières cellules pluripotentes constituant l'embryon subissent des phases successives de proliférations symétriques, de régionalisations et de spécifications. Ces cellules originelles ne se maintiennent pas et leur identité évolue au cours du temps. A l'inverse, au sein d'un tissu fonctionnel, les cellules souches pluripotentes effectuent principalement des divisions asymétriques, générant d'un côté une cellule fille destinée à être spécifiée, et de l'autre une cellule similaire à celle d'origine. Au cours du temps, ces cellules souches sont la cible de différents signaux, notamment de position, orientant les cellules filles générées vers un destin particulier. Le maintien de ces cellules au cours du temps et la génération de différents types de dérivés sont les deux critères cardinaux d'une cellule souche.

moléculaires appelées **niches** (Morrison and Spradling, 2008). Ces niches assurent le maintien d'un microenvironnement adéquat autour d'une quantité limitée de cellules souches. Elles en contrôlent étroitement le nombre et l'activité proliférative, ainsi que le type des dérivés générés dans le temps (Figure 1). Elles intègrent pour cela différents signaux extérieurs indicateurs de l'état du tissu, de l'organisme et de son environnement (Scadden, 2014).

Les niches de cellules souches qui persistent à l'âge adulte sont essentielles au maintien et au renouvellement de plusieurs tissus, comme le système hématopoïétique (cellules souches de la moelle osseuse), la peau (épiderme et follicule pileux), l'intestin (crypte intestinale), les muscles ou encore les cellules du mésenchyme (os, cartilage et adipocytes, générés depuis la moelle osseuse) (Morrison and Spradling, 2008). Contrairement à ces tissus, le **système nerveux** des vertébrés est un des rares tissus à être principalement constitué de cellules post-mitotiques qui semblent incapables de se renouveler au cours du temps ou après une lésion.

1.2 Le système nerveux des vertébrés

1.2.1 Organisation anatomique

Sur le plan anatomique, le système nerveux des vertébrés est divisé en un système nerveux **central** (SNC) et un système nerveux **périphérique** (SNP). Le SNC est constitué des structures suivantes organisées selon l'axe rostro-caudal (Figure 2) :

- le télencéphale, contenant entre autres le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, le bulbe olfactif, ou encore les ganglions de la base (striatum et pallidum) ;
- le diencéphale, structure abritant notamment le thalamus ;
- le mésencéphale, qui est constitué de plusieurs noyaux, dont la substance noire ;
- le rhombencéphale, constitué par le pont, le bulbe rachidien et le cervelet ;
- et enfin la moelle épinière, partie postérieure d'où émergent les nerfs spinaux.

Ces structures sont organisées autour d'un système ventriculaire central commun dans lequel circule le liquide cébrospinal. Celui-ci circule également au niveau des méninges qui entourent le cerveau. Le SNC est densément irrigué par des vaisseaux sanguins, mais il est isolé de la circulation sanguine par la *barrière hémato-encéphalique* qui assure une séparation cellulaire et moléculaire du système. Enfin, le SNC des vertébrés est protégé physiquement par la présence des os et des cartilages du crâne et de la colonne vertébrale.

Le SNP est constitué de 10 paires de nerfs crâniens, 30 paires de nerfs spinaux, de nombreux ganglions (qui regroupent les corps cellulaires des neurones sensoriels et

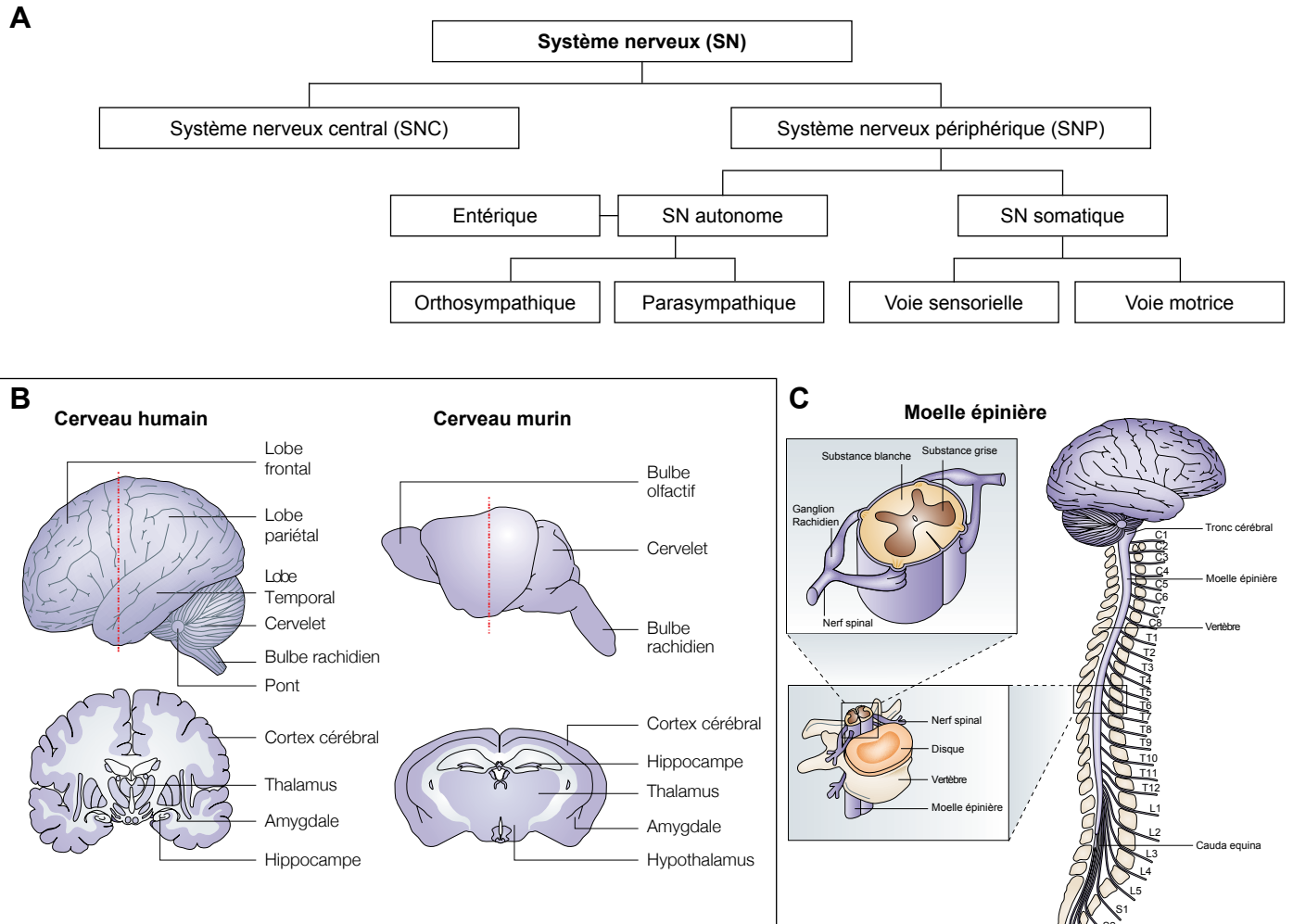


Figure 2 Organisation du système nerveux central et périphérique.

A, Le système nerveux est constitué d'une partie centrale (SNC), qui contient notamment le cerveau et la moelle épinière, et d'une partie périphérique (SNP), constituée des nerfs et ganglions des systèmes nerveux somatique et autonome. **B**, Des structures identiques, mais de tailles et de localisations relatives différentes, se retrouvent dans le cerveau humain et murin. **C**, La moelle épinière se situe dans le prolongement de l'encéphale. Comme le reste du SNC, elle présente une substance blanche et une substance grise. Elle est le point d'accroche des nerfs spinaux du SNP. Ceux-ci sont mixtes et composés d'une branche ventrale motrice et d'une branche dorsale sensorielle, présentant notamment le ganglion rachidien.

autonomes) et d'un ensemble de récepteurs présents dans le reste du corps. Il peut être divisé sur le plan fonctionnel en une voie motrice, ou efférente, assurant le contrôle du SNC sur les muscles, et une voie sensorielle, assurant le retour des informations sur l'environnement et l'état du corps vers le SNC. La voie motrice est subdivisée en un système somatique et un système autonome, lui-même contenant des fibres nerveuses sympathiques, parasympathiques et entériques. Le système somatique sensoriel est constitué des nerfs sensoriels et des ganglions sensoriels (Figure 2).

1.2.2 Principaux types cellulaires du système nerveux adulte

Le tissu nerveux est constitué de deux types principaux de cellules : les neurones et les cellules gliales. Les **neurones** sont les cellules excitables chargées de traiter et transmettre de l'information sous forme de dépolarisations électriques le long de leur membrane. Cette information est le plus souvent transmise d'un neurone à un autre par la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses. Ces neurotransmetteurs peuvent avoir un effet excitateur (ex. du glutamate), inhibiteur (ex. du GABA) ou modulateur (ex. de la dopamine) sur le neurone post-synaptique. Les synapses sont réparties le long de deux types de prolongements : les dendrites qui reçoivent l'information (*input*) et l'axone qui transmet cette information (*output*). Via ces prolongements, les neurones sont organisés en réseaux hautement interconnectés à travers le SNC. Ils sont hétérogènes et peuvent être classifiés selon différentes propriétés (cf. Figure 3).

La *glie* est un terme général désignant l'ensemble des cellules supportant la fonction des neurones. Il existe pourtant une grande diversité de cellules gliales : astrocytes, oligodendrocytes, cellules NG2, cellules de Schwann, cellules engainantes, microglies, etc. Les **astrocytes** assurent différentes fonctions de support et de protection, tels que le maintien de la barrière hémato-encéphalique, l'apport de nutriment au tissu nerveux ou le contrôle de la balance ionique du milieu extracellulaire. Ils participent de plus à la cicatrisation du tissu nerveux et aux processus inflammatoires. Ils jouent un rôle inattendu dans la formation et le fonctionnement des synapses et leur importance dans la transmission et le traitement de l'information cérébrale commence seulement à être explorée (Araque et al., 2014). Il existe deux grandes classes d'astrocytes : les astrocytes fibreux qui ont une forme étoilée et sont présents dans la *substance blanche* et les astrocytes protoplasmiques qui eux ont une forme plus touffue, contactent souvent un vaisseau sanguin et sont situés préférentiellement dans la *substance grise* (Figure 3) (Bayraktar et al., 2014).

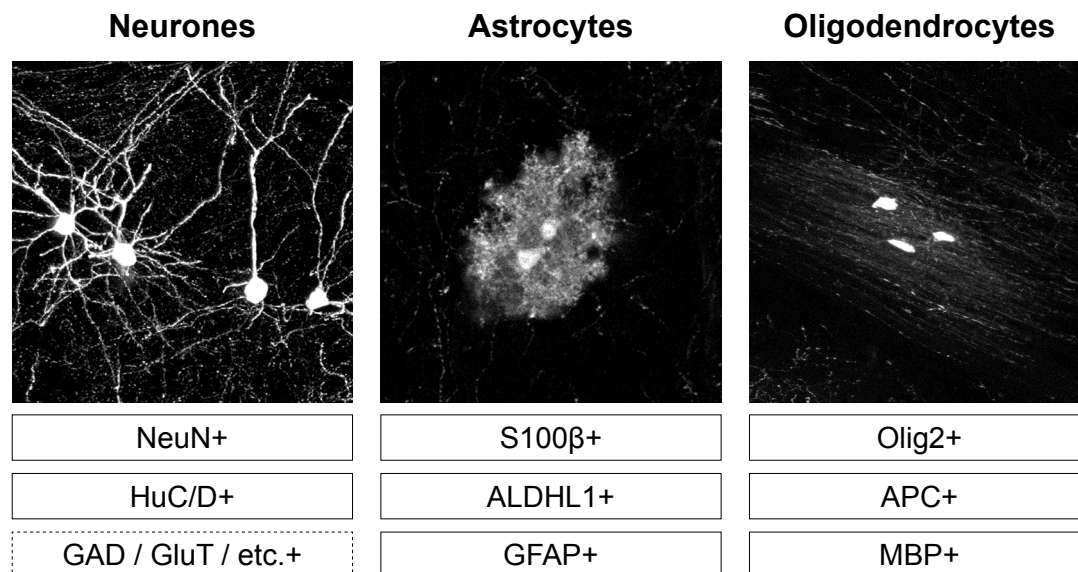


Figure 3 Morphologies et marqueurs moléculaires des principaux types cellulaires du SNC.

Les neurones sont identifiables par la présence de dendrites et d'un axone dont les ramifications sont caractéristiques de leur fonction (ici, neurones à projection du cortex). Les neurones sont identifiables par immunohistochimie grâce aux marqueurs dits *pan*-neuronaux, NeuN et Hu. Les différentes classes de neurones sont, elles, distinguées par l'utilisation de marqueurs spécifiques dépendant souvent du type de neurotransmetteur utilisé par ces neurones. Les astrocytes protoplasmiques présentent une morphologie buissonnante couvrant une zone restreinte autour du corps cellulaire et sont souvent en contact avec un vaisseau sanguin. Les oligodendrocytes de la substance blanche présentent un corps cellulaire plus petit et de fines extensions parallèles venant myéliniser un ensemble d'axones sur une zone restreinte. NeuN, neuronal nuclei ; HuC/D, membres C et D de la famille des protéines Hu (RNA-binding protein) ; GAD, glutamic acid decarboxylase (spécifique des neurones GABAergique) ; GluT, glutamate transporter (neurones glutamatergique) ; GFAP, glial fibrillary acidic protein ; ALDH1L1, aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1, ; Olig2, oligodendrocyte transcription factor 2 ; APC, adenomatous polyposis coli protein ; MBP, myelin basic protein.

Les **oligodendrocytes** sont des cellules capables de former la gaine de myéline, une gaine isolante assurant la conduction saltatoire de l'influx électrique le long des axones. Ces cellules sont principalement situées dans la substance blanche et sont capables de myéliniser plusieurs axones simultanément autour d'une certaine zone (Figure 3). Ils sont générés par des précurseurs d'oligodendrocytes qui expriment le protéoglycane NG2 (*neural/glial antigen2*). Ces **cellules NG2** semblent constituer un type glial à part entière et exercent des fonctions additionnelles à celle de précurseur d'oligodendrocyte. Elles pourraient notamment constituer un type particulier de cellules souches latentes du SNC (Richardson et al., 2011).

Dans le SNP, la myélinisation est assurée par les **cellules de Schwann** qui s'enroulent autour d'un unique axone au niveau des nerfs. Des cellules de Schwann non-myélinisantes sont également présentes autour des axones de faible diamètre.

Les **cellules engainantes du système olfactif** (*olfactory ensheathing cells*, OEC) sont un type particulier de cellules gliales du nerf olfactif et du bulbe olfactif. Les OEC possèdent des propriétés à mi-chemin entre cellules de Schwann et astrocytes. Elles sont notamment impliquées dans le guidage des axones des *neurones récepteurs* de l'épithélium olfactif vers le SNC (Su and He, 2010). Leurs propriétés surprenantes leur permettent d'autre part de faciliter la régénération axonale lorsqu'elles sont transplantées sur le site d'une lésion, par exemple après une section de la moelle épinière (Su and He, 2010; Tabakow et al., 2014).

Enfin, la **microglie** est un type de cellule dérivé des macrophages qui joue le rôle de cellules immunitaires du SNC. La microglie est importante pour la phagocytose des cellules mortes durant le développement et la vie adulte (Sierra et al., 2010). En cas de lésion du SNC, elles changent d'état pour devenir *activées* et sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules sont aux centres des processus d'inflammation et de nombreuses pathologies neurodégénératives (Tang et al., 2015).

1.2.3 Développement du système nerveux

Le tissu nerveux se forme à partir d'un feuillet primitif, le neuroectoderme, spécifié dans la partie dorsale de l'embryon en fin de gastrulation. Durant la neurulation, ce feuillet se referme en un **tube neural** qui va donner naissance aux structures du SNC (Figure 4A). Les bords du neuroectoderme ont un devenir différent : ils se rejoignent dans la partie dorsale lors de la fermeture du tube et vont constituer la **crête neurale**, structure à l'origine entre autres des dérivés neuronaux et gliaux du SNP (Figure 4A). La fermeture du tube conduit à la formation d'un canal central qui est à l'origine du système ventriculaire.

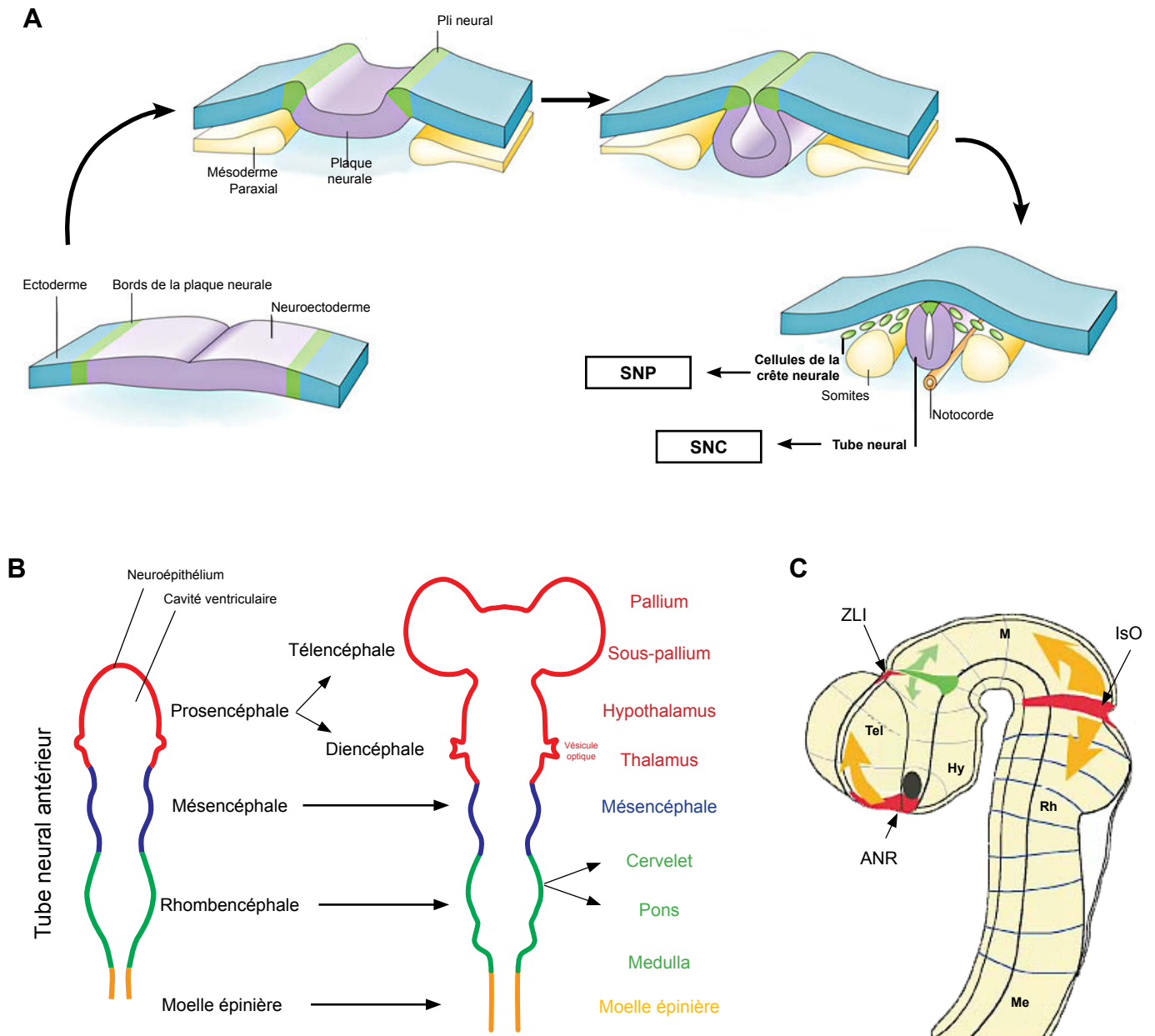


Figure 4 Les différentes étapes de développement du système nerveux.

A, Le tissu nerveux se forme à partir de l'ectoderme dans la partie dorsale de l'embryon. Au cours de la neurulation, ce neuroectoderme se replie pour former le tube neural et la crête neurale. **B**, La partie antérieure du tube neural forme trois, puis cinq vésicules qui vont donner naissance aux différentes parties du SNC. La cavité formée par la fermeture du tube donne naissance au système ventriculaire. **C**, Les différentes structures du SNC antérieur sont régionalisées depuis trois centres organisateurs principaux (en rouge) par la sécrétion de molécules diffusibles appelées morphogènes (FGF en orange et SHH en vert). ZLI, *zona limitans intrathalamica* ; ANR *anterior neural ridge* ; IsO, organisateur de l'isthme ; Tel, télencéphale ; Hy, hypothalamus ; M, mésencéphale ; Rh, rhombencéphale ; Me, moelle épinière.

Durant la suite du développement, la partie antérieure du tube neural forme rapidement trois vésicules primitives (Figure 4B) : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se divise ensuite en trois vésicules cérébrales : les deux vésicules symétriques du télencéphale et le diencéphale. Le télencéphale se subdivise en *pallium* qui donnera naissance aux différentes régions du cortex (comme l'hippocampe) et en *subpallium* qui donnera naissance aux ganglions de la base (striatum et pallidum) (Figure 5B). La partie postérieure du tube formera la moelle épinière autour du canal de l'épendyme (Figure 4B).

La formation correcte de ces différentes vésicules et de leurs futures régions est dépendante de l'établissement de **gradients de morphogènes** qui segmentent le tube neural selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral (Figure 4C). Les morphogènes sont des molécules diffusibles qui activent les voies de signalisation nécessaires à l'identification et à la spécification des tissus (Shilo et al., 2013). Ils sont produits à partir de différents **centres organisateurs** selon une dynamique spatio-temporelle critique pour la formation correcte des différentes régions du SNC. Par exemple, la régionalisation du prosencéphale est induite par l'action croisée des FGFs (*Fibroblast growth factor*) produits au niveau de sa partie antérieure, des Wnts (*Wingless*) et BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) qui sont produites dans sa partie dorso-médiale, et enfin du SHH (*Sonic hedgehog*) produit dans sa partie ventrale (Figure 4C et 5A) (Rowitch and Kriegstein, 2010). C'est également sous l'action de ces morphogènes que débute de façon régionalisée la **neurogenèse embryonnaire** au niveau de la paroi du tube neural.

1.2.4 La neurogenèse embryonnaire

La neurogenèse est définie comme l'ensemble des mécanismes qui conduisent à la formation d'un neurone fonctionnel intégré dans un circuit neuronal. Avec un sens plus large, elle désigne également la formation d'un système nerveux mature, comprenant alors la formation des cellules gliales et la maturation des réseaux neuronaux. Chez la souris, la neurogenèse débute à partir du 10^{ème} jour de développement embryonnaire (E10) dans l'ensemble du neuroectoderme et se prolonge jusqu'aux premières semaines après la naissance dans certaines structures (neurogenèse dite postnatale ou *protracted* - prolongée) (Bonfanti, 2013).

Le neuroectoderme est initialement constitué d'une couche monocellulaire de cellules neuroépithéliales en intense prolifération (Figure 5C). Au début de la neurogenèse, ces cellules se différencient en cellules de **glie radiaire**. Les glies radiaires sont des cellules polarisées : elles présentent un corps cellulaire dans la zone ventriculaire, un contact avec le

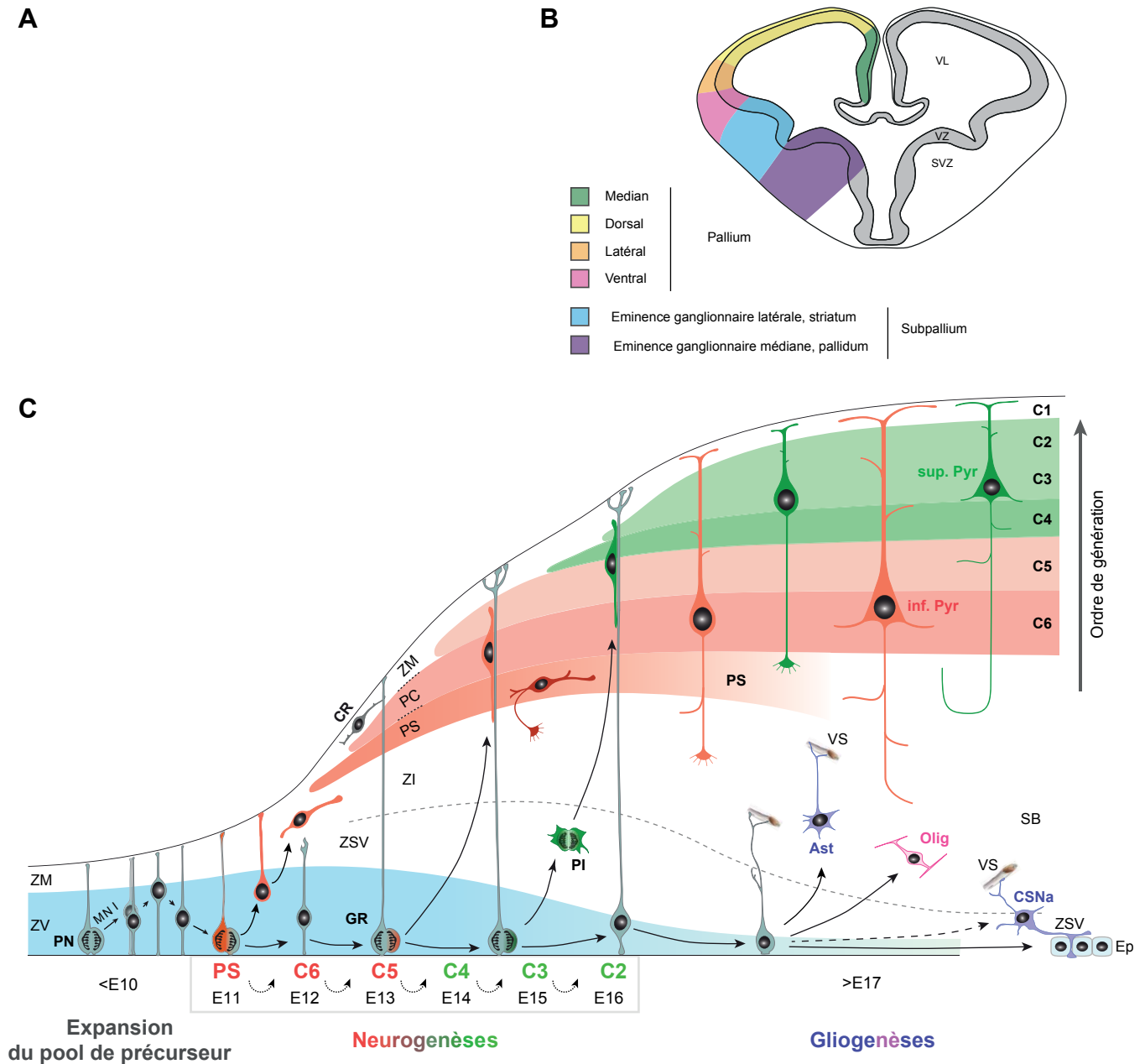


Figure 5 Les glies radiaires, élément central de la neurogenèse embryonnaire.

A, Différentes signalisations provenant de quatre centres organisateurs régionalisent le télencéphale durant l'embryogenèse (Rowitch and Kriegstein, 2010). **B**, La localisation des différentes structures embryonnaires du télencéphale, vu en coupe coronale. **C**, Après une phase de prolifération, les précurseurs du neuroépithélium se différencient en cellules de glie radiaire (GR). Au niveau du cortex, une GR génère successivement les neurones pyramidaux des couches profondes, puis superficielles (neurogenèse dites *inside-out*). Vers E17,5, la neurogenèse laisse la place à une gliogenèse (astrocytes et oligodendrocytes). Après la naissance, les GR disparaissent pour laisser place à une fine couche de cellules épendymaires bordant les ventricules. Certaines GR vont néanmoins conserver leurs propriétés souches et générer des cellules souches neurales adultes de la SVZ. Ast, astrocytes ; C1-6, couche corticale ; CR, cellule de Cajal-Retzius ; CSNa, cellule souche neurale adulte ; Ep, cellule épendymaire ; GR, glie radiaire ; MNI, mouvement nucléaire intercinétique ; Olig, oligodendrocytes ; PC, plaque corticale ; PI, précurseur intermédiaire ; PN, précurseur neuroépithélial ; PS, plaque sous-corticale ; inf. Pyr, neurone pyramidal des couches inférieures (C5-6) ; sup. Pyr, neurone pyramidal des couches supérieures (C2-4) ; VS, vaisseau sanguin ; ZM, zone marginale ; ZSV, zone sous-ventriculaire ; ZV, zone ventriculaire. Adapté de (Kwan et al., 2012) avec les données de (Guo et al., 2013).

système ventriculaire au travers d'un *cil primaire* et étendent un long prolongement vers la surface apicale du tissu nerveux. Durant la neurogenèse, elles constituent non seulement le support de la migration radiale des neurones immatures (neuroblastes) mais sont aussi les cellules souches à la source de la quasi-totalité des neurones et cellules gliales du SNC (Figure 5C) (Malatesta and Götz, 2013). Elles expriment un ensemble de gènes caractéristiques, tels que *Nestin*, *Sox2* et *RC2*. Par des *mouvements nucléaires intercinétiques*, la position de leur noyau est dépendante de la phase du cycle cellulaire et elles effectuent leurs divisions au niveau de la zone ventriculaire (Figure 5C). Bien qu'elles soient capables de générer directement un neurone immature, une majorité d'entre elles génèrent des précurseurs intermédiaires qui prolifèrent transitoirement au niveau de la zone sous ventriculaire avant de se différencier en neurones (Figure 5C).

Les glies radiaires sont régionalisées à travers le neuroépithélium en territoires spécifiés pour générer différentes populations neuronales et gliales. Comme mentionné précédemment, cette régionalisation passe par les gradients de morphogènes qui structurent le SNC (Figure 4C et 5A). Au niveau du prosencéphale, quatre régions se distinguent le long de l'axe dorso-ventral : le pallium, l'éminence ganglionnaire latérale (LGE), l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) et le septum (Figure 5B). Les glies radiaires du pallium vont générer les différentes populations des neurones de projection du cortex (Figure 5C). Celles du LGE vont produire les interneurones du striatum et du bulbe olfactif, alors que celles du MGE fournissent les interneurones du cortex ainsi que les neurones à projection du pallidum et de certaines structures de la base du cerveau (Bayraktar et al., 2014). Les neurones immatures générés par ces structures embryonnaires rejoignent leur destination par migration radiale pour les neurones à projection (Figure 5C) ou tangentielle pour les interneurones.

Ce patron de différenciation est également contrôlé dans le temps. Ainsi, les glies radiaires du pallium produisent initialement des neurones des couches profondes (E11-E13) avant de générer des neurones des couches superficielles (E14-E16) (neurogenèse dites *inside-out*, Figure 5C). Les cellules gliales sont ensuite produites vers la fin du développement embryonnaire – les premiers astrocytes sont détectés vers E16 et les premiers oligodendrocytes à la naissance (P0) – jusqu'aux premières semaines de développement postnatal chez la souris (Bayraktar et al., 2014).

Une seule même glie radiaire est-elle capable de générer successivement ces différents dérivés au cours de sa vie ? En suivant le devenir de glies radiaires à l'échelle *clonale*, par l'utilisation d'une lignée Cre-inductible avec un faible taux de recombinaison (Magavi et al., 2012) et l'utilisation de la lignée rapportrice *confetti* (Guo et al., 2013), deux études récentes

ont pu démontrer qu'une même glie radiaire du pallium est en effet capable de générer successivement *in vivo* des neurones de différentes couches, puis des oligodendrocytes et des astrocytes. Il coexisterait cependant des glies radiaires au potentiel plus restreint, puisque les auteurs observent également des clones ne contenant qu'un seul type cellulaire.

Les glies radiaires constituent ainsi les cellules souches centrales du développement et de la neurogenèse du SNC (Malatesta and Götz, 2013). Chez les mammifères, leur disparition progressive après la naissance coïncide avec une diminution de la prolifération cellulaire à travers le tissu nerveux. Celui-ci continue pourtant d'évoluer à différentes échelles.

1.3 Plasticité du système nerveux et découverte de la neurogenèse adulte.

Les premiers neuroanatomistes émirent hypothèse – qui devint un dogme – selon laquelle le système nerveux adulte est immuable et qu'à l'inverse de nombreux tissus les cellules neuronales ne se renouvellent pas. Les cinquante dernières années de recherche en neurosciences ont peu à peu renversé ce dogme et montré que les mécanismes du développement laissent place à des mécanismes de **plasticité** (Figure 6).

La plasticité est une propriété permettant à une structure de se modifier sous une action extérieure et de conserver par la suite cette modification (à l'inverse de l'élasticité). Après la naissance, le système nerveux est extrêmement plastique, ce qui permet une phase de maturation des réseaux neuronaux nécessaire à l'apprentissage des capacités motrices, cognitives et émotionnelles de l'individu, de l'enfance à l'adolescence. Chez l'adulte, la plasticité du système nerveux devient plus limitée mais reste nécessaire à de nombreuses fonctions incluant l'apprentissage, la mémorisation ou encore la régénération fonctionnelle après un traumatisme. Cette plasticité passe notamment par la modification et la réorganisation des synapses qui forment les réseaux neuronaux (Figure 6) (Castrén and Hen, 2013).

Plus étonnement, certaines structures cérébrales présentent une forme supplémentaire de plasticité : leurs fonctions nécessitent la formation et l'intégration continue de nouveaux neurones au sein de leurs réseaux, ce qui implique le maintien d'une **neurogenèse adulte** (Lledo et al., 2006). L'étude intensive de la **plasticité neurale** de ces structures a conduit à l'identification et à la caractérisation des niches de **cellules souches neurales adultes** du SNC des vertébrés (Figure 6).

La découverte et la caractérisation de ces cellules souches neurales et de la neurogenèse adulte sont allées de paire avec la mise au point de techniques spécifiques permettant d'étudier des mécanismes caractéristiques du développement (i.e. prolifération, spécification,

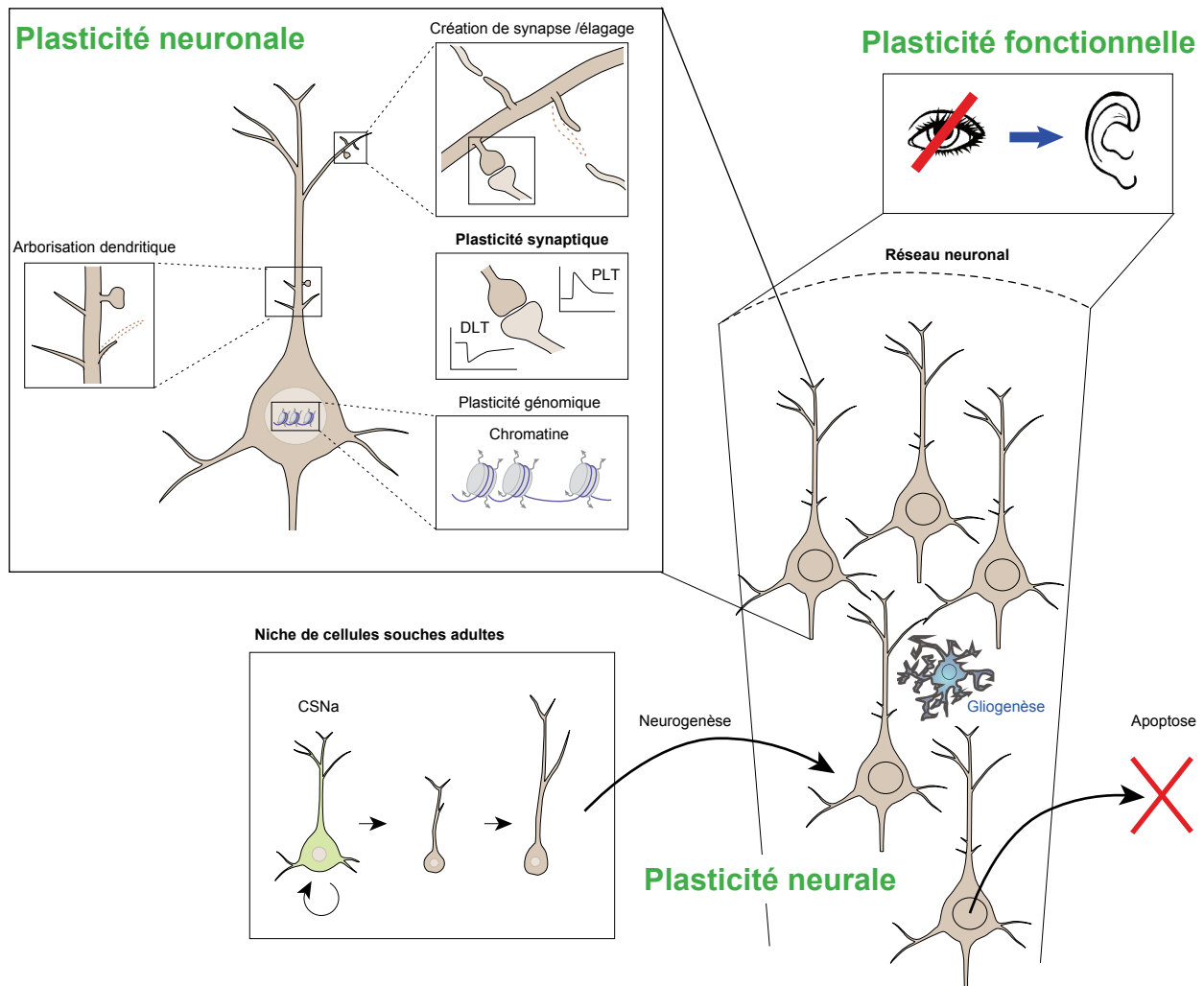


Figure 6 Différentes formes de plasticité du système nerveux.

Il existe plusieurs échelles de plasticité au sein des réseaux neuronaux :

- La plasticité neuronale désigne l'ensemble des modifications intervenant au sein d'un neurone. Elle inclut notamment sa capacité à modifier avec l'expérience la force de ses connexions synaptiques (plasticité synaptique), leurs nombres et leurs localisations. Ces modifications changent la façon dont le neurone interagit avec le réseau et, à l'échelle de plusieurs neurones, la façon dont ce réseau traite l'information. A plus long terme, l'expression des gènes est affectée, notamment à travers des modifications de conformation de la chromatine.
- Certaines structures du système nerveux abritent des niches de cellules souches permettant une plasticité neurale. En condition physiologique ou pathologique, ces niches apportent de nouveaux composants cellulaires (glies ou neurones) qui viennent durablement modifier le réseau. A l'inverse, les cellules du système nerveux inutilisées sont éliminées par apoptose.
- Enfin, l'utilisation d'un même réseau neuronal est susceptible d'évoluer avec le temps. La perte de la vue entraîne par exemple une réattribution des aires visuelles du cortex vers le traitement d'autres informations sensorielles, telle l'ouïe. Ce mécanisme assure un certain niveau de plasticité fonctionnelle au système nerveux (plasticité cérébrale). Schéma adapté de (Castren and Hen, 2013).

migration et différenciation) dans un tissu adulte fonctionnel (Figure 7). En 1965, Altman et Das sont parmi les premiers à utiliser l'incorporation de la Thymidine tritiée durant la division cellulaire pour démontrer l'apparition de nouvelles cellules neurales chez le rat adulte (Altman and Das, 1965). Dans les années 90, L'isolation de cellules souches neurales adultes *in vitro* (Reynolds and Weiss, 1992) et leurs réimplantations dans le tissu adulte pour suivre leur comportement (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) furent essentielles pour faire accepter la présence d'une neurogenèse adulte continue chez les mammifères. Suite à ces premières expériences, l'utilisation du BromodeoxyUridine (BrdU, un analogue de la thymidine non-radioactif), qui permet de marquer et suivre spécifiquement des cellules nouvellement générées par division cellulaire, a contribué à l'accélération des découvertes dans ce domaine (Figure 7). Enfin, la caractérisation des marqueurs immunohistochimiques des cellules immatures et les différentes techniques de traçage conditionnel, notamment la génération d'un véritable arsenal de souris génétiquement modifiées, vinrent plus récemment compléter ces approches (Figure 7).

Grâce à l'ensemble de ces découvertes, il est désormais accepté que – bien qu'il existe différentes populations de précurseurs gliogéniques distribuées à travers le cerveau – seules quelques niches isolées de **cellules souches neurales** sont capables de maintenir une neurogenèse adulte nécessaire au bon fonctionnement du SNC (Ming and Song, 2011; Bonfanti, 2013). Chez la souris, modèle d'étude utilisé durant ma thèse, deux niches neurogéniques majeures sont décrites :

- la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe qui génère des neurones granulaires du GD ;
- et la zone ventriculaire/sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux qui génère des neuroblastes (neurones immatures) qui migrent à travers le cerveau antérieur pour se différencier en différents types d'interneurones du bulbe olfactif (BO).

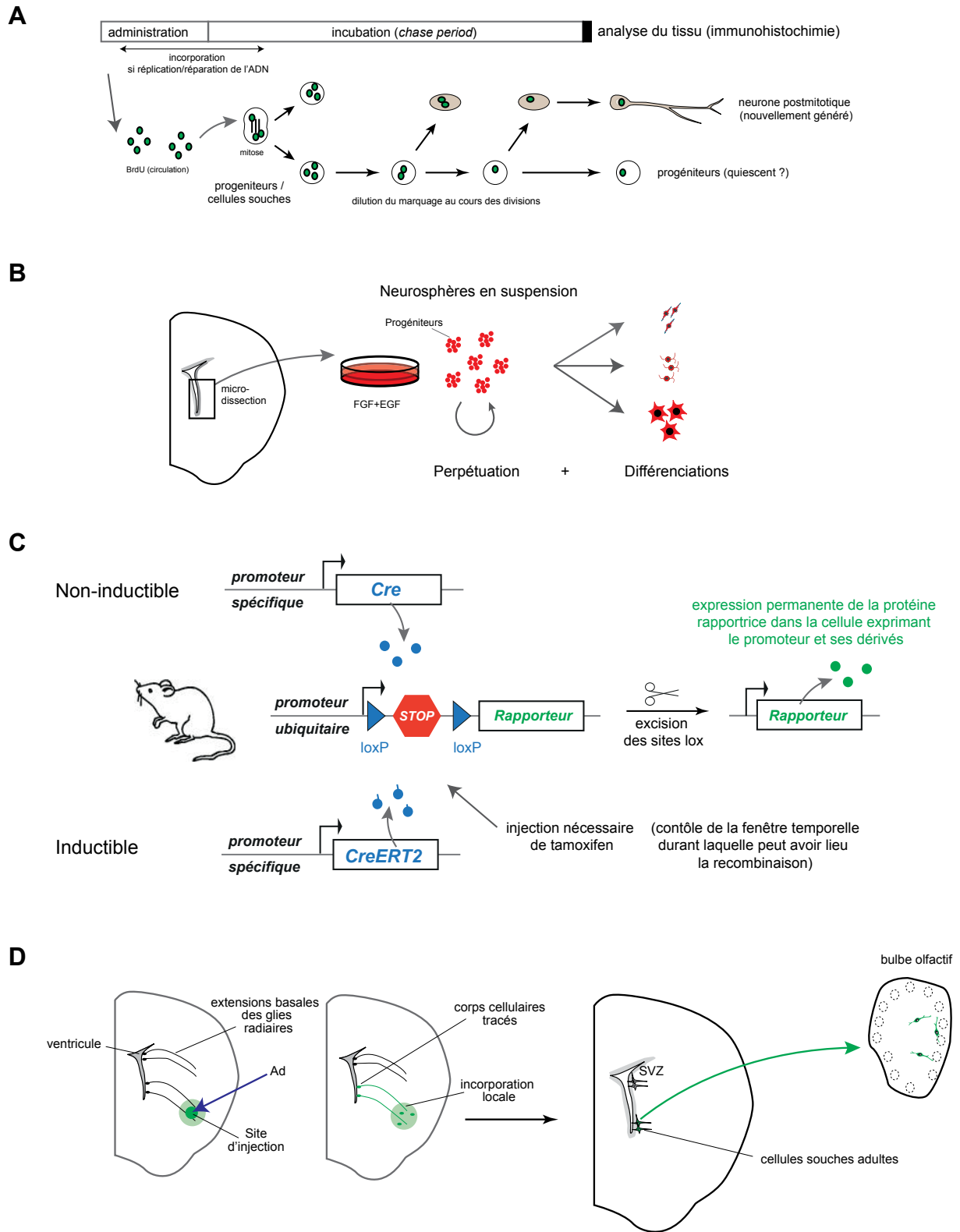


Figure 7 Principales techniques utilisées pour l'étude de la neurogenèse adulte.

A, L'administration de BrdU permet de marquer les cellules issues d'une division cellulaire dans une période de temps donnée. **B**, Le test des neurosphères permet d'évaluer *in vitro* la capacité des cellules d'une structure à proliférer et à générer différents dérivés et est donc un test indicateur de la présence de cellules souches ou progénitrices. **C**, Les systèmes de traçage basés sur le système Cre-lox permettent de suivre le lignage cellulaire de population exprimant un gène déterminé. Ces constructions peuvent être intégrées au génome par transgénèse ou *knock-in* (lignées génétiquement modifiées) ou, ponctuellement, via injection de virus recombinant (cf. **D**). **D**, Le traçage d'une population de glias radiaires postnatales par injection localisée d'adénovirus permet d'évaluer leur capacité à générer des cellules souches chez l'adulte et de suivre spécifiquement les différents dérivés générés par ces dernières.

2 La neurogenèse de l'hippocampe

2.1 Organisation et fonctions du gyrus dentelé de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure de l'archicortex rattachée au système limbique. Chez les rongeurs il présente une forme incurvée, s'étendant du septum dans sa partie antérieure dorsale, au cortex temporal dans sa partie postérieure ventrale (Figure 8A). Il est formé de trois sous-structures principales : CA1, CA3 et le GD. L'hippocampe présente des couches de neurones excitateurs parmi les plus denses et les mieux stratifiées du SNC (Figure 8B). Ces neurones forment un réseau centré sur une boucle tri-synaptique (Figure 8C). L'hippocampe est connecté au reste du cerveau par le cortex entorhinal (voie d'entrée en provenance des cortex somatosensoriels et associatifs), le *subiculum* (voie de sortie vers le cortex) et la *fimbria* (qui le connecte, entre autre, à l'hippocampe controlatéral, au thalamus, à l'amygdale, aux noyaux du septum et aux corps mamillaires de l'hypothalamus) (Figure 8C). L'hippocampe est impliqué dans la consolidation de l'information, la mémoire à court et long-terme et la navigation spatiale. Il joue également un rôle dans le contrôle du stress, de l'anxiété et des émotions (Rolando and Taylor, 2014).

Le GD constitue la structure d'entrée de l'information dans l'hippocampe (Amaral et al., 2007). Il est composé de trois couches : la couche moléculaire, la couche granulaire et le hile (cf. Figure 11). La couche granulaire est presque exclusivement composée de neurones granulaires densément compactés. Ce sont les principaux neurones excitateurs du GD. Leur corps cellulaire se situe dans la couche granulaire et leurs dendrites arborescent la couche moléculaire où elles reçoivent les fibres afférentes du cortex entorhinal (*voie perforante*, Figure 8C). Les axones quittent le corps cellulaire par le hile et forment la *fibre moussue* non-myélinisée en direction de CA3. Ils effectuent des connexions « en passant » avec les neurones pyramidaux de CA3 au niveau d'imposants boutons synaptiques où ils sécrètent principalement du glutamate. En plus des neurones granulaires, il existe de nombreuses populations d'interneurones réparties dans les différentes couches du GD (Amaral et al., 2007). Enfin, la partie inférieure de la couche granulaire, appelée zone sous-granulaire (SGZ) contient une niche de cellules souches neurales adultes qui génère de nouveaux neurones granulaires tout au long de la vie postnatale et adulte (Figure 8C et 11).

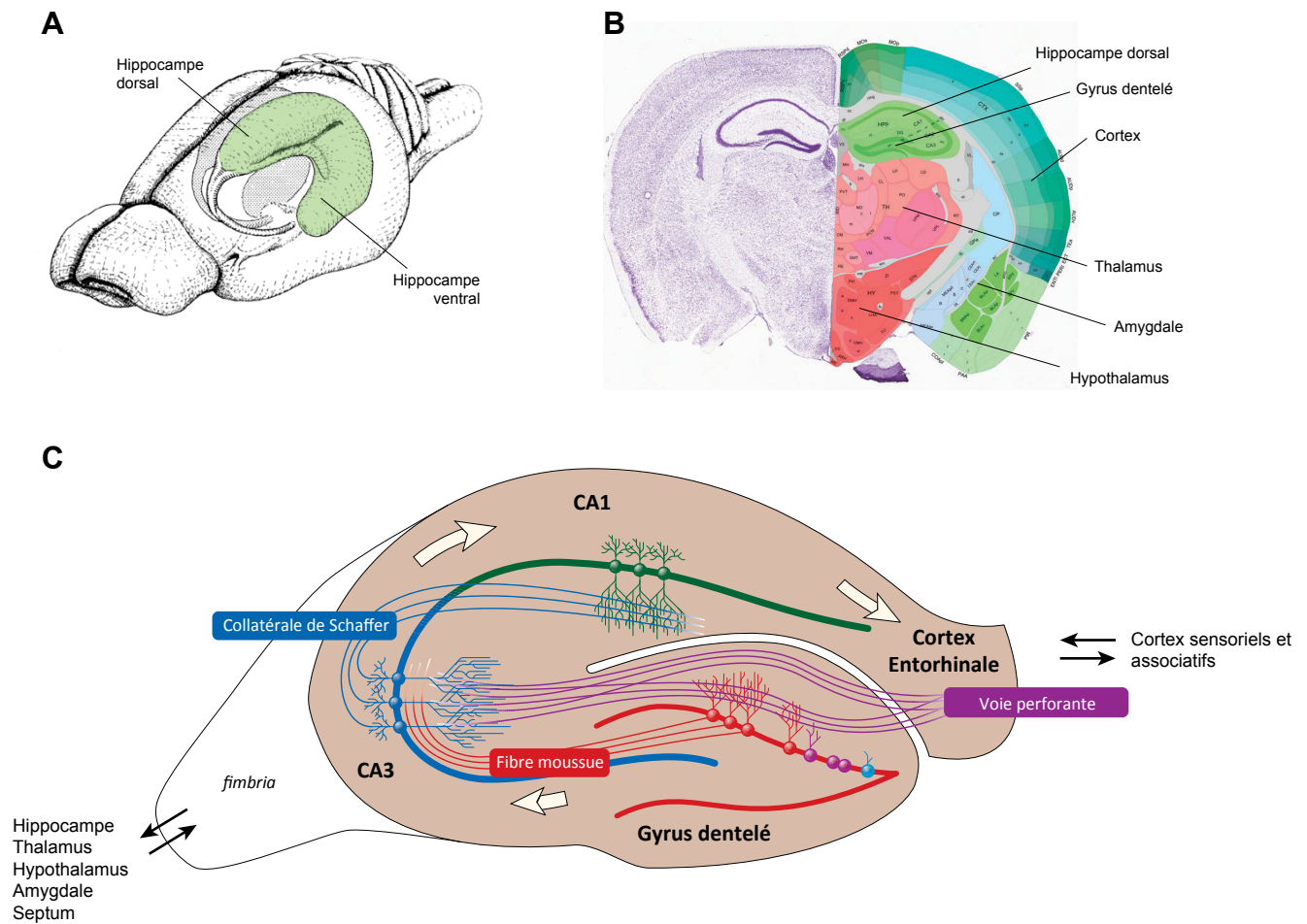


Figure 8 Localisation, anatomie, populations et connexions du gyrus dentelé de l'hippocampe.

A, L'hippocampe est une structure symétrique courbe, située sous le cortex dans la partie postérieure du cerveau. Il présente, chez le rongeur, un pôle dorsal et un pôle ventral. **B**, En coupe, l'hippocampe possède une structure caractéristique constituée de deux V intercalés, correspondant aux champs ammoniens (CA1 et CA3) et au gyrus dentelé. **C**, Le gyrus dentelé constitue le point d'entrée de l'information synaptique. Les cellules granulaires (en rouge) reçoivent des connexions synaptiques provenant du cortex via la voie perforante (en violet). Les axones des cellules granulaires, aussi appelés fibre moussue (*Mossy fiber*), établissent des synapses excitatrices avec les cellules pyramidales de CA3 (en bleu). Celles-ci transmettent vers les cellules pyramidales de CA1 (en vert) via les collatérales de Schaffer. A leur tour, les cellules de CA1 renvoient l'information traitée vers le cortex entorhinal. Ce circuit principal constitue ainsi une boucle tri-synaptique fermée entre le cortex entorhinal, le gyrus dentelé, CA3 et CA1 (flèches blanches). La *fimbria* est la seconde voie d'entrée et de sortie de l'hippocampe. A travers cette bande de matière blanche, principalement constituée d'axones myélinisés, l'hippocampe est en interaction avec le thalamus, l'hypothalamus, les noyaux du septum, l'amygdale et l'hippocampe controlatéral. Au cœur de l'hippocampe, seuls les axones granulaires du gyrus dentelé sont renouvelés au cours de la vie adulte (bleu clair-violet-rouge).

2.2 Développement du gyrus dentelé et mise en place de la niche neurogénique adulte

Chez la souris, le GD se forme durant une période étendue du 13^{ème} jour de développement embryonnaire (E13) jusqu'au quinzième jour du développement postnatal (P15) (Yu et al., 2014). Comment cette structure du cortex maintient-elle des cellules souches actives jusqu'à l'âge adulte ?

2.2.1 Spécification du gyrus dentelé par le cortical hem

Le GD est spécifié à partir de la partie médiane du pallium par le *cortical hem* (ou ourlet cortical), situé dans la partie ventrale du pallium médian (Figure 5A, B et 9). Ce centre organisateur secrète des morphogènes responsables de l'expression régionalisée de facteurs de transcription (p. ex. *Emx1/2*, *Pax6*, *Lhx2*, *Lef1*, etc.) déterminants pour l'identité des structures du pallium (Subramanian et al., 2009). Le *cortical hem* spécifie d'un côté le plexus choroïde (via la signalisation BMPs) et de l'autre l'hippocampe (signalisation impliquant *Wnt3a*) (Figure 9) (Mangale et al., 2008). Dans un second temps, il spécifie le territoire du GD dans la partie proximale de l'hippocampe, notamment par l'activation Wnt-dépendante du facteur de transcription *Lef1*. Cette signalisation en provenance du *cortical hem* agit à la fois sur la prolifération des progéniteurs neuraux du GD et sur la formation des échafaudages de glie radiaire (*radial glial scaffold*) nécessaires à la morphogenèse particulière de cette partie du cortex (Subramanian et al., 2009; Hodge et al., 2013; Urbán and Guillemot, 2014).

2.2.2 Neurogenèse du gyrus dentelé embryonnaire

Contrairement à la formation du cortex, où la neurogenèse se fait majoritairement depuis des glies radiaires situées dans la zone ventriculaire, la neurogenèse du GD s'effectue depuis différentes *matrices neurogéniques* qui se forment progressivement à distance de la zone ventriculaire (Urbán and Guillemot, 2014). Durant les premières phases de neurogenèse, les futures cellules du GD migrent depuis la zone ventriculaire et forment une *dentate migratory stream* (ou DMS) vers le gyrus en formation. Les progéniteurs neuraux s'accumulent au niveau de la jonction entre la *fimbria* et le gyrus et formeraient alors une seconde matrice neurogénique (Figure 10A). Progressivement, des progéniteurs neuraux s'établiraient à l'intérieur du GD et constitueraient vers la naissance une troisième matrice neurogénique au niveau du hile. D'autre part, certaines études décrivent la formation d'une zone *subpiaie* de progéniteurs dans la partie externe du gyrus en formation (Figure 10A) (Li et al., 2009; Hodge et al., 2012).

Les progéniteurs présents dans ces différentes matrices neurogéniques génèrent des neurones granulaires immatures de façon continue durant le développement embryonnaire et

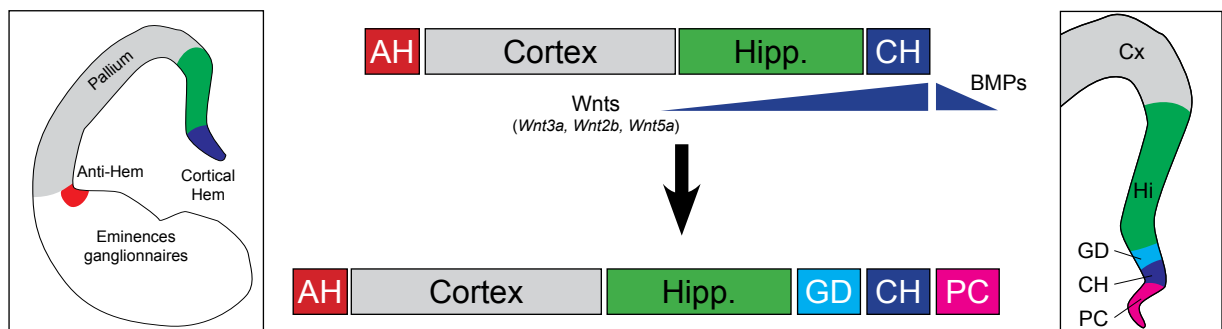


Figure 9 Développement du gyrus dentelé à partir du pallium médian.

La partie centrale de la figure représente une vue dépliée du pallium (futur cortex, Cx) et sa régionalisation en différentes structures sous l'action croisée de signalisation en provenance du *cortical hem* (CH) et de l'anti-hem (AH). Le neuroépithélium du gyrus dentelé (GD) est spécifié au niveau du pallium médian vers le treizième jour du développement embryonnaire (E13) entre le CH et le futur hippocampe (Hipp.) sous l'action probable d'un gradient de morphogènes de la famille Wnt. Le CH spécifie également les plexus choroides (PC).

postnatal (Hodge et al., 2013). Ces neurones granulaires immatures se rassemblent en une couche granulaire discernable à partir de E17,5 (Figure 10A).

2.2.3 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la neurogenèse embryonnaire du GD

Au cours de leur différenciation, les progéniteurs de neurones granulaires expriment plusieurs facteurs de transcription (p. ex : *Sox2*, *Neurogenin 2*, *Tbr2*, *NeuroD*, *Prox1*, etc.). Trois gènes clés dans le contrôle de ce processus ont été identifiés : *Sox2*, *Tbr2* et *Prox1* (Sugiyama et al., 2013) ; (Hodge et al., 2013).

Sox2 est exprimé par les glies radiaires et les cellules souches du GD postnatal et est requis pour la maintenance des cellules souches durant le développement, notamment par la régulation de la signalisation SHH (Favaro et al., 2009). Ces glies radiaires *Sox2*⁺ génèrent des neurones immatures, à la fois par différenciation directe et par la production de progéniteurs intermédiaires exprimant le facteur de transcription *Tbr2* (*T-box brain 2*). Ces progéniteurs intermédiaires prolifèrent activement au niveau des différentes matrices neurogéniques avant de se différencier à leur tour (Hodge et al., 2012). L'inactivation de *Tbr2* conduit à une neurogenèse aberrante du GD embryonnaire et postnatal (Hodge et al., 2012; 2013). Enfin, les neurones immatures post-mitotiques expriment le facteur de transcription *Prox1* (*Prospero homeobox 1*) qui est nécessaire à établir leur identité de neurone granulaire du GD et permet de les différencier des neurones pyramidaux de CA3 ou CA1 (Iwano et al., 2012).

2.2.4 Les glies radiaires du GD : échafaudage glial à l'origine des cellules souches adultes ?

Après la naissance, les différentes populations de progéniteurs des matrices primaire, secondaire et tertiaire diminuent et laissent place à une unique zone neurogénique sous-granulaire, de sorte que, à l'âge adulte, la neurogenèse des neurones granulaires provient exclusivement de cellules souches établies dans la SGZ (Figure 10A) (Urbán and Guillemot, 2014). Il n'est pas clair si cette réorganisation des zones neurogéniques est due à une différenciation des progéniteurs ou à une migration de ceux-ci vers la SGZ.

Pour comprendre l'origine de ces cellules souches adulte, plusieurs études se sont penchées sur l'évolution des glies radiaires du GD (Xu et al., 2014). Les premières glies radiaires spécifiées pour former le GD expriment différents marqueurs caractéristiques (*Nestin*, *Sox2*, *GLAST* (*glutamate aspartate transporter*), *RC2* (*Radial glial cell marker-2*) et *BLBP* (*Brain Lipid Binding Protein*), etc.) (Brunne et al., 2010) auxquels s'ajoute vers E15 le

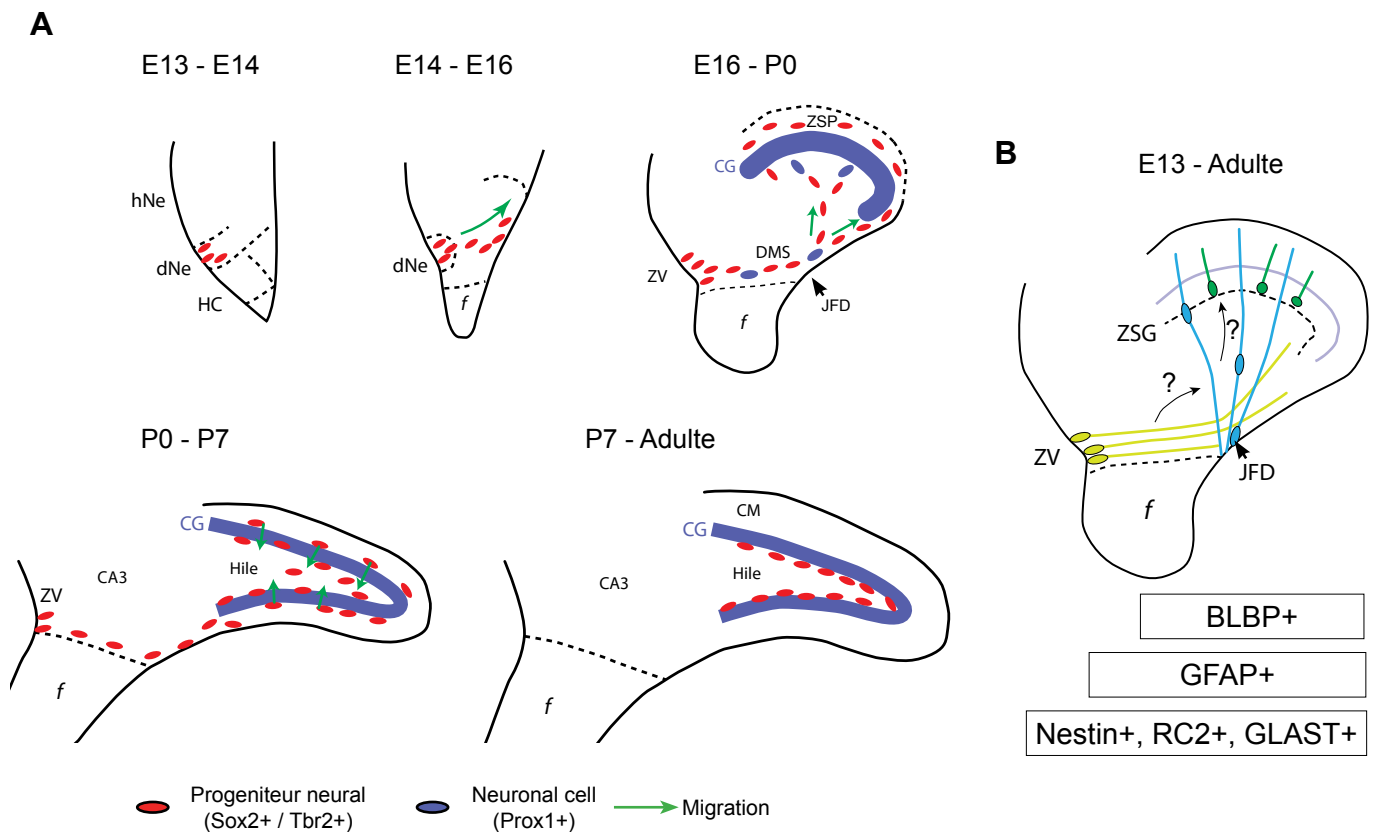


Figure 10. Le développement du gyrus dentelé repose sur trois matrices neurogéniques générant différentes phases de migrations et de neurogénèses.

A, Le neuroépithélium du GD (dNe) est spécifié vers le treizième jour du développement embryonnaire (E13) entre l'hème cortical (HC) et le futur hippocampe (hNe). Les cellules progénitrices du GD (en rouge) situé au niveau de la zone ventriculaire (ZV) génèrent une vague de migration vers le gyrus en formation à partir de E14. Cette migration (formant la *dentate migratory stream*, DMS) est constitué de cellules progénitrices et de neurones immatures (en bleu). Ces derniers forment progressivement la future couche granulaire (CG). Une fois arrivée dans le GD, les cellules progénitrices se répartissent au niveau du hile et d'une zone subpiale (ZSP) entourant la CG. Elles continuent à générer localement des neurones granulaires. A partir de la naissance, les cellules de la ZSP et du hile migreraient vers la partie inférieure de la CG. Elles formeraient la zone neurogénique adulte sous-granulaire (ZSG).

B, Les glias radiaires constituent la population centrale de ce développement. Elles sont à la fois les cellules souches progénitrices initiales et l'échaffaudage sur lesquelles les cellules progénitrices et les neurones immatures migrent. Au début localisées au niveau de la ZV (vert pâle), l'échaffaudage glial se déplace durant le développement embryonnaire au niveau de la jonction entre la fimbria et le GD (JFD, en cyan), puis progressivement s'établit au niveau du hile et de la ZSG après la naissance (vert sombre). Les glias radiaires expriment progressivement différents marqueurs gliaux spécifiques comme GFAP ou BLBP. Elles forment donc trois échafaudages successifs essentiels à la morphogénèse du GD et à la formation de la niche adulte. Schémas partiellement adaptés de (Hodge et al., 2013).

marqueur GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) qui est plus spécifique de cette partie du neuroépithélium (Figure **10B**) (Barry et al., 2008). Comme pour l'ensemble du cortex, les glies radiales du GD constituent à la fois la source des neurones excitateurs du GD et *l'échafaudage* le long duquel ces neurones migrent. Elles sont centrales pour la neurogenèse et la morphogenèse correctes du GD (Barry et al., 2008; Xu et al., 2014). A l'inverse du reste du cortex, l'architecture gliale du GD se modifie au cours du développement pour former **trois échafaudages successifs** (Brunner et al., 2010). Ces trois phases semblent refléter l'évolution des matrices neurogéniques décrites dans les paragraphes précédents, cependant le lien entre les deux n'a pas été clairement établi (Figure **10B**) :

- l'échafaudage initial longe la *fimbria* pour rejoindre le gyrus en formation ;
- un second échafaudage glial apparaît à mesure que le gyrus prend forme et s'étend de la jonction *fimbria* - gyrus jusqu'à la zone piale du GD ;
- après la naissance, un troisième échafaudage glial se forme entre le hile et la couche moléculaire.

Durant la formation de ces différents échafaudages, les cellules radiales conservent l'expression de marqueurs caractéristiques (tels que *GFAP*, *Nestin*, *GLAST*, *BLBP*, etc.) que l'on retrouvera également chez les cellules souches adultes (Li et al., 2009; Brunner et al., 2010). Malgré cette continuité des marqueurs immunohistochimiques, il n'existe pas encore de démonstration par traçage génétique que ces trois échafaudages représentent un seul et même lignage continu de glie radiale menant à la formation des cellules souches adultes (Figure **10B**). Il est cependant supposé que les cellules souches adultes se forment à partir des glies radiales composant le troisième échafaudage glial, entre P10 et P21 chez la souris (Xu et al., 2014; Yu et al., 2014). Les glies radiales qui ne se maintiennent pas dans la SGZ se différencieraient parallèlement en astrocytes de la couche moléculaire (Brunner et al., 2010). Les facteurs qui contrôlent l'établissement des cellules souches dans la SGZ durant cette phase de transition ne sont pas encore connus. Le facteur de transcription NFIX (Nuclear Factor 1 X) semble nécessaire à ce contrôle car l'inactivation du gène *Nfix* conduit à un défaut de positionnement des cellules souches au niveau de la SGZ au stade P20 (Martynoga et al., 2013).

D'autre part, il n'est pas évident que toutes les glies radiales du GD embryonnaire participent à la génération des cellules souches adultes. Récemment, l'équipe de Samuel Pleasure a étudié le devenir des cellules souches sensibles à la signalisation Hh (au moyen des lignées *Gli1-nLacZ* et *Gli1-CreERT2*) durant le développement postnatal. Leurs résultats montrent qu'une population de cellules localisées dans la zone ventriculaire temporo-ventrale

du GD entre E17,5 et P0 est capable de générer une grande partie des cellules souches du GD dorsal (Li et al., 2013). Les résultats de cette étude laissent penser que l'origine des cellules souches adultes pourrait être régionalisée durant l'embryogenèse. Ainsi, si l'implication des glies radiaires dans la morphogenèse et la neurogenèse du GD est clairement établie, les étapes cellulaires (morphologie, migration) et moléculaires (quiescence vs gliogenèse) qui les mènent à générer une cellule souche adulte restent encore à clarifier.

2.3 La neurogenèse adulte du GD

2.3.1 Etapes cellulaires

Une fois établies après les premières semaines après la naissance, les **cellules souches neurales adultes** du GD adoptent une morphologie radiale caractéristique, avec un corps cellulaire situé dans la SGZ et un prolongement cytoplasmique qui traverse la couche granulaire et vient former une arborisation dans le premier tiers de la couche moléculaire (Figure 11). Ces cellules conservent des caractéristiques de glies radiaires et expriment certains gènes spécifiques aux cellules gliales (p. ex. *GFAP*, *BLBP*, etc.) et aux progéniteurs neuronaux (p. ex. *Nestin*, *Sox2*, etc.) (Ming and Song, 2011). Ces cellules sont essentiellement quiescentes (ou inactives) et sont souvent dénommées **cellules de type I**. Il existerait également des cellules souches présentant une morphologie non radiale au niveau de la SGZ mais leur indépendance vis-à-vis du lignage des cellules de type I reste à déterminer (Suh et al., 2007). Similairement aux glies radiaires du GD embryonnaire, lorsqu'elles sont activées les cellules de type I donnent naissance à des **progéniteurs transitoires** en effectuant plusieurs cycles de divisions asymétriques. Ces progéniteurs transitoires (ou cellules de type II) effectuent eux-mêmes plusieurs cycles de divisions symétriques rapides qui vont permettre d'augmenter leur nombre. Ils se différencient à travers plusieurs étapes continues au cours desquelles ils expriment différentes combinaisons de marqueurs caractéristiques (p. ex. *Sox2*, *Nestin*, *Mash1*, *Dlx2*, *Tbr2*, *DCX*, *Prox1*, etc.). Devenus **neuroblastes**, puis neurones immatures, ils migrent radialement sur une très courte distance et s'intègrent au niveau de la couche granulaire (Figure 11) (Ming and Song, 2011).

La **maturation** des nouveaux neurones granulaires s'étend sur plusieurs semaines (Deng et al., 2010). Au cours de cette maturation, une grande majorité des nouveaux neurones sont éliminés par apoptose. Les neurones granulaires nouvellement formés présentent une ramification dendritique moins élaborée et ont transitoirement des propriétés électrophysiologiques différentes des neurones matures (Esposito, 2005; Ge et al., 2007) :

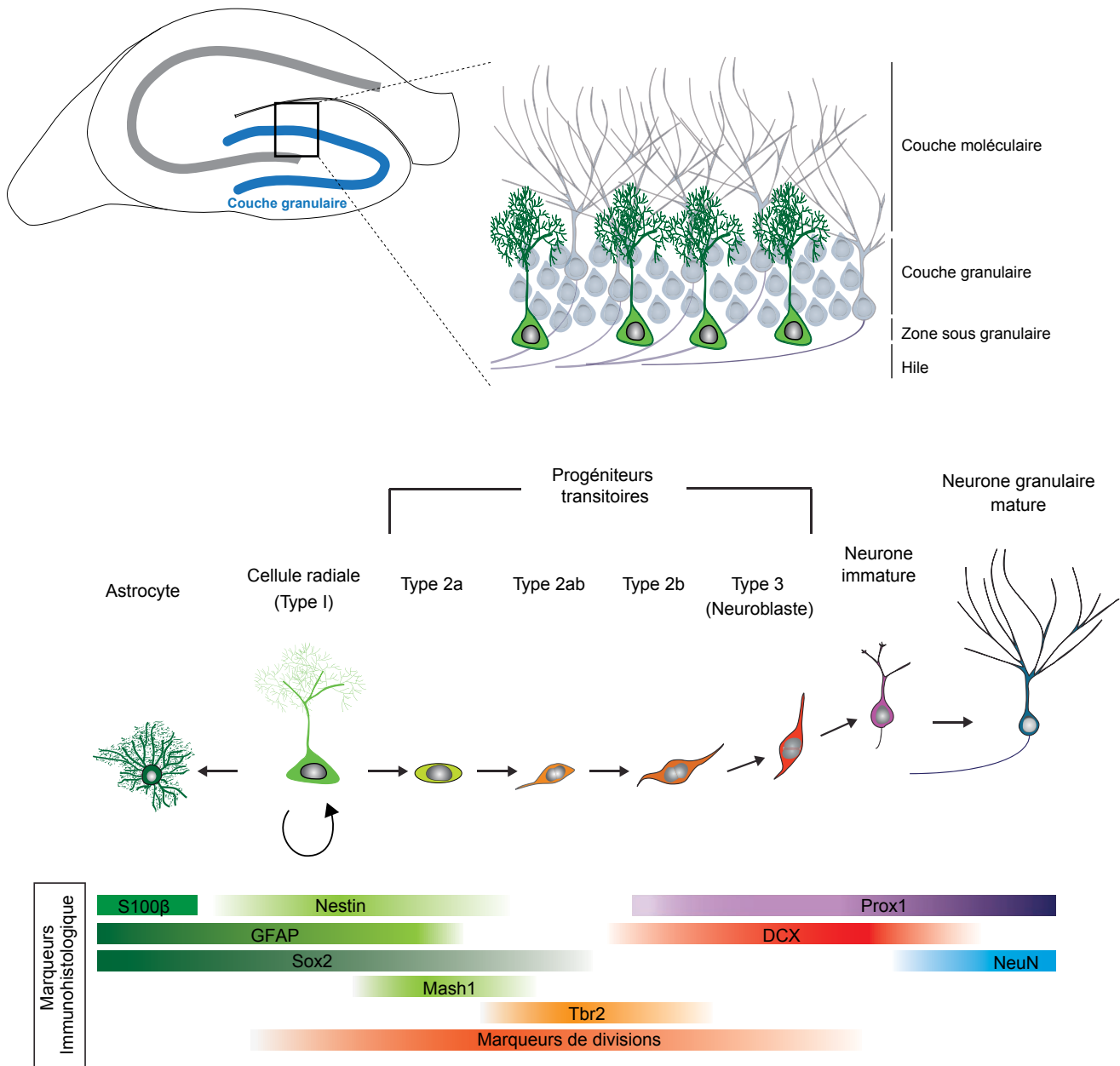


Figure 11 Etapes cellulaires de la neurogenèse adulte du gyrus dentelé

Les cellules souches (dites de type I) sont des cellules radiales à la morphologie caractéristique située dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé. Elles génèrent de nouveaux neurones granulaires matures qui s'intègrent dans la couche granulaire. Cette neurogenèse passe par une succession de progéniteurs transitoires intermédiaires qui prolifèrent activement. Ces différents types cellulaires sont identifiés par l'expression de plusieurs marqueurs moléculaires schématisée dans la partie inférieure de la figure. Les cellules souches de type I sont également susceptibles de générer des astrocytes. Figures remodelées de (Bonaguidi et al., 2012).

- Ils sont hyperexcitables et présentent une phase de plasticité synaptique accrue durant une période critique pour leur intégration et utilisation dans le circuit.
- Ils répondent tout d'abord à un niveau tonique de GABA sécrété dans le milieu extracellulaire par les interneurons présents localement. Ils reçoivent ensuite des *inputs* synaptiques GABAergiques (en provenance des interneurons locaux), puis Glutamatergiques (en provenance de la voie perforante) au cours de leur maturation.
- Ils étendent dans le même temps leur axone vers CA3 et forment des synapses sur des dendrites préexistantes de cellules pyramidales de CA3.

Leur maturation s'achève environ 2 mois après leur naissance ; ces nouveaux neurones matures générés à l'âge adulte sont alors similaires aux neurones granulaires matures générés durant la période embryonnaire (Deng et al., 2010; Ming and Song, 2011).

En plus des neurones, il a été rapporté que les cellules souches de type I sont capables de générer des astrocytes de la couche moléculaire et du hile (Figure 11). Cette gliogenèse pourrait notamment constituer la dernière étape du cycle cellulaire d'une cellule souche activée (processus de *différenciation terminale* en astrocyte). Ce mécanisme pourrait expliquer l'épuisement progressif des cellules souches et la diminution de la neurogenèse avec le temps (Bonaguidi et al., 2012).

2.3.2 Quelques éléments sur la régulation de la neurogenèse adulte

De nombreux facteurs liés à l'activité comportementale et cognitive sont susceptibles d'affecter la neurogenèse à l'âge adulte : la présence d'un environnement enrichi, la pratique d'une activité physique, les tâches d'apprentissage dépendantes de l'hippocampe, le vieillissement ou encore les interactions sociales. D'autres facteurs extérieurs, tels que le stress, la prise d'antidépresseurs, certaines mutations liées à des maladies psychiatriques ou encore certaines drogues, peuvent aussi conditionner la neurogenèse adulte (Rolando and Taylor, 2014).

Ces différentes conditions sont susceptibles d'affecter la neurogenèse adulte en agissant sur l'activation ou la *quiescence* des cellules souches, la prolifération des progéniteurs, la survie des neurones immatures ou au contraire leur apoptose. Ces modifications seraient induites par l'activation de plusieurs voies de signalisation, impliquant morphogènes (p. ex. les voies Notch, SHH, BMP, Wnt) et facteurs de croissance (p. ex. les voies VEGF, IGF1, BDNF), qui sont présentes au niveau de la niche et modulées par l'activité neuronale, la microglie, les astrocytes ou encore le système vasculaire (Faigle and Song, 2013).

2.4 Fonctions de la neurogenèse adulte

Les neurones granulaires générés durant la vie adulte représentent environ 10 % de la population totale de neurones granulaires (Imayoshi et al., 2008). L'apparition continue de nouveaux neurones granulaires au sein du réseau de l'hippocampe semble être un processus fonctionnel et non régénératif. Les nouveaux neurones disposent d'une *période critique*, c'est à dire une phase où le neurone présente une plasticité accrue qui va être déterminante pour leur utilisation ou non par le circuit (Deng et al., 2010). Comment cet apport constant de neurones immatures participe-t-il aux fonctions du GD ?

Un des rôles supposés du GD est de permettre de séparer des *patterns* d'activité proches en provenance du cortex entorhinal pour permettre un encodage séparé au niveau de CA3 de deux événements présentant des contextes similaires (rôle de *pattern separation*). Grâce à leurs propriétés, les neurones granulaires immatures sont plus facilement activables par ces *inputs* en provenance du cortex entorhinal que les neurones matures. Ils pourraient ainsi participer à cette fonction de *pattern separation* en facilitant la diversification des cohortes de neurones recrutés par des expériences similaires. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'une inhibition de la neurogenèse adulte provoque une diminution de la capacité de l'animal à séparer deux contextes proches. Au contraire, une augmentation artificielle de la neurogenèse adulte améliore cette capacité (Deng et al., 2010).

En parallèle avec ce rôle, plusieurs études (révisé par (Zhao et al., 2008; Drew et al., 2013)) ont montré une contribution significative de la neurogenèse adulte dans les processus de navigation spatiale, de rétention à long terme des informations spatiales, de conditionnement contextuel par la peur, ainsi que dans les mécanismes d'oubli ou encore durant la réorganisation de la mémoire vers le néocortex. D'autre part, la neurogenèse est négativement affectée par le stress et les pathologies de l'affect (dépression, anxiété, stress post-traumatique, etc.) et serait un des médiateurs de l'effet de certains antidépresseurs (Snyder et al., 2011). Ces deux catégories de fonctions (cognitive et émotionnelle) sont dépendantes de la région de l'hippocampe étudiée : alors que l'hippocampe dorsal est principalement lié à la mémoire et à la navigation spatiale et projette vers les aires associatives du cortex, l'hippocampe ventrale est plus liée à l'affect (l'humeur) et projette préférentiellement vers le reste du système limbique (amygdale, noyaux *accumbens*, hypothalamus, etc.). La neurogenèse adulte pourrait avoir une régulation et un impact fonctionnel différents dans ces deux zones (Cameron and Glover, 2013).

2.5 Neurogenèse de l'hippocampe adulte chez l'Homme

Lorsqu'en 1998 l'équipe de Fred Gage démontra sa présence chez l'homme, la neurogenèse adulte devint acceptée comme un phénomène commun à l'ensemble des mammifères. Son analyse de tissus *post-mortem* de patients atteints de cancer et ayant reçu des injections thérapeutiques de BrdU révèle la présence de neurones ayant incorporé le BrdU et donc de cellules neurogéniques au sein de l'hippocampe humain (Eriksson et al., 1998). Plus récemment, le laboratoire de Jonas Frisen a confirmé ces résultats en étudiant l'évolution de l'incorporation de ^{14}C dans l'ADN de différents types cellulaires à la suite de l'augmentation transitoire du taux de ^{14}C atmosphérique après les tests de bombes nucléaires ayant eu lieu entre 1955 et 1963 (Figure 12). Cette étude de datation des cellules de l'hippocampe humain a permis de montrer qu'environ un tiers des neurones du GD se renouvellent durant la vie adulte (Spalding et al., 2013).

L'importance fonctionnelle des nouveaux neurones chez l'Homme reste à déterminer. Les études basées sur des modèles animaux suggèrent que la neurogenèse adulte constituerait une cible thérapeutique pour le traitement de différentes maladies psychiatriques et neurologiques. Chez l'homme, une activité neurogénique anormale pourrait ainsi jouer un rôle dans la physiopathologie de conditions variées, comme la dépression, la réponse au stress, l'effet de certains antidépresseurs, l'anxiété, le stress post-traumatique, l'épilepsie, la schizophrénie, le vieillissement cognitif, la maladie d'Alzheimer, l'addiction ou encore le syndrome de l'X fragile (Drew et al., 2013).

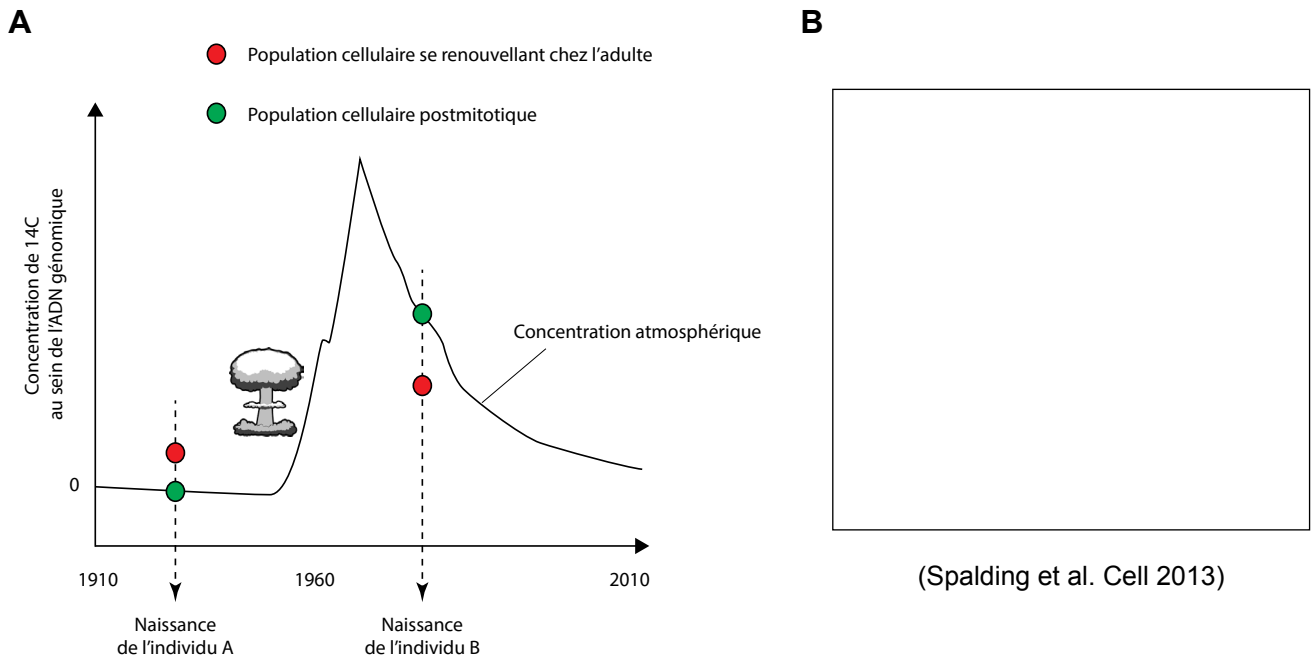


Figure 12. Mise en évidence de la neurogenèse adulte par datation au ^{14}C de l'âge des cellules.

A, Représentation des résultats de datation au ^{14}C . Durant la guerre froide, les tests de bombes nucléaires effectués entre 1955 et 1963 ont provoqué une élévation transitoire du taux de carbone 14 (^{14}C) dans l'atmosphère. Lors d'une division cellulaire, les cellules incorporent au sein de leur ADN une concentration de ^{14}C proportionnelle à celle de l'atmosphère. Il est ainsi possible de dater l'âge des populations cellulaires d'un tissu au moment de la mort de l'individu (ici en 2010). Les neurones ne se divisent pas après la naissance et devraient donc présenter une concentration similaire à celle de l'atmosphère au moment de la naissance de l'individu (population verte). Une population qui se renouvelle au cours de la vie de l'individu (population rouge) présente un taux de ^{14}C différent du taux atmosphérique. Il lui est supérieur si l'individu est né avant le pic (individu A) ou inférieur si l'individu est né après (individu B). **B**, En couplant cette méthode de datation et différents modèles computationnels, (Spalding et al., 2013) ont pu confirmer l'existence d'une neurogenèse adulte de l'hippocampe humain.

3 La neurogenèse adulte de la zone sous-ventriculaire murine

Chez les rongeurs, la neurogenèse du bulbe olfactif (BO) perdure durant toute la vie (Lim and Álvarez-Buylla, 2014). Étonnamment, cette neurogenèse adulte ne repose pas sur la présence de cellules souches au sein même de la structure, comme c'est le cas pour le GD. La source des nouveaux neurones du BO est en effet située à plusieurs millimètres de distance, au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux (Figure 13).

3.1 Etapes cellulaires, de la SVZ jusqu'au BO

La zone ventriculaire qui borde le système ventriculaire du SNC est majoritairement composée de cellules épendymaires ciliées (cellules de type E1 et E2) (Mirzadeh et al., 2008). Ces cellules assurent l'étanchéité du système ventriculaire et la circulation du liquide cébrospinal (LCS). Les murs des ventricules latéraux présentent une **zone sous-ventriculaire** (SVZ) possédant une cyto-architecture particulière (Figure 13A). Elle abrite en effet des cellules souches neurales adultes qui ne sont présentes qu'à ce niveau du système ventriculaire (Lim and Álvarez-Buylla, 2014). En raison d'une classification basée sur des critères ultrastructurels, ces cellules souches sont traditionnellement appelées **cellule B1** (Doetsch et al., 1997). Leur corps cellulaire réside directement sous la couche des cellules épendymaires, ce qui a conduit à qualifier cette couche de *sous-ventriculaire*.

Les cellules B1 génèrent des cellules progénitrices à prolifération transitoire (*transit amplifying precursor*), appelées **cellule de type C**. Contrairement aux cellules B1, les cellules C prolifèrent rapidement et génèrent des progéniteurs neuronaux, les **neuroblastes** (ou cellule de type A) (Figure 13A, D). Ces neuroblastes migrent « en chaine » à travers la SVZ et se rassemblent dans sa partie antérieure pour former un chemin de migration caudo-rostral, appelé **RMS** (de *rostral migratory stream*) (Figure 13B). Ce chemin stéréotypé traverse le cerveau antérieur pour rejoindre le BO. Les neuroblastes migrent alors radialement vers différentes couches du BO et se différencient en différents types d'interneurones qui s'intègrent dans le circuit neuronal du BO (révisé par (Lim and Álvarez-Buylla, 2014) et (Ming and Song, 2011)). L'analyse du cycle cellulaire des différentes populations indique qu'après avoir été générée par une cellule B1, la cellule C se divise trois fois, symétriquement, avant de se différencier en neuroblaste. Les neuroblastes vont encore se diviser une ou deux fois avant de sortir du cycle cellulaire et devenir des cellules post-mitotiques (Figure 13D) (Ponti et al., 2013).

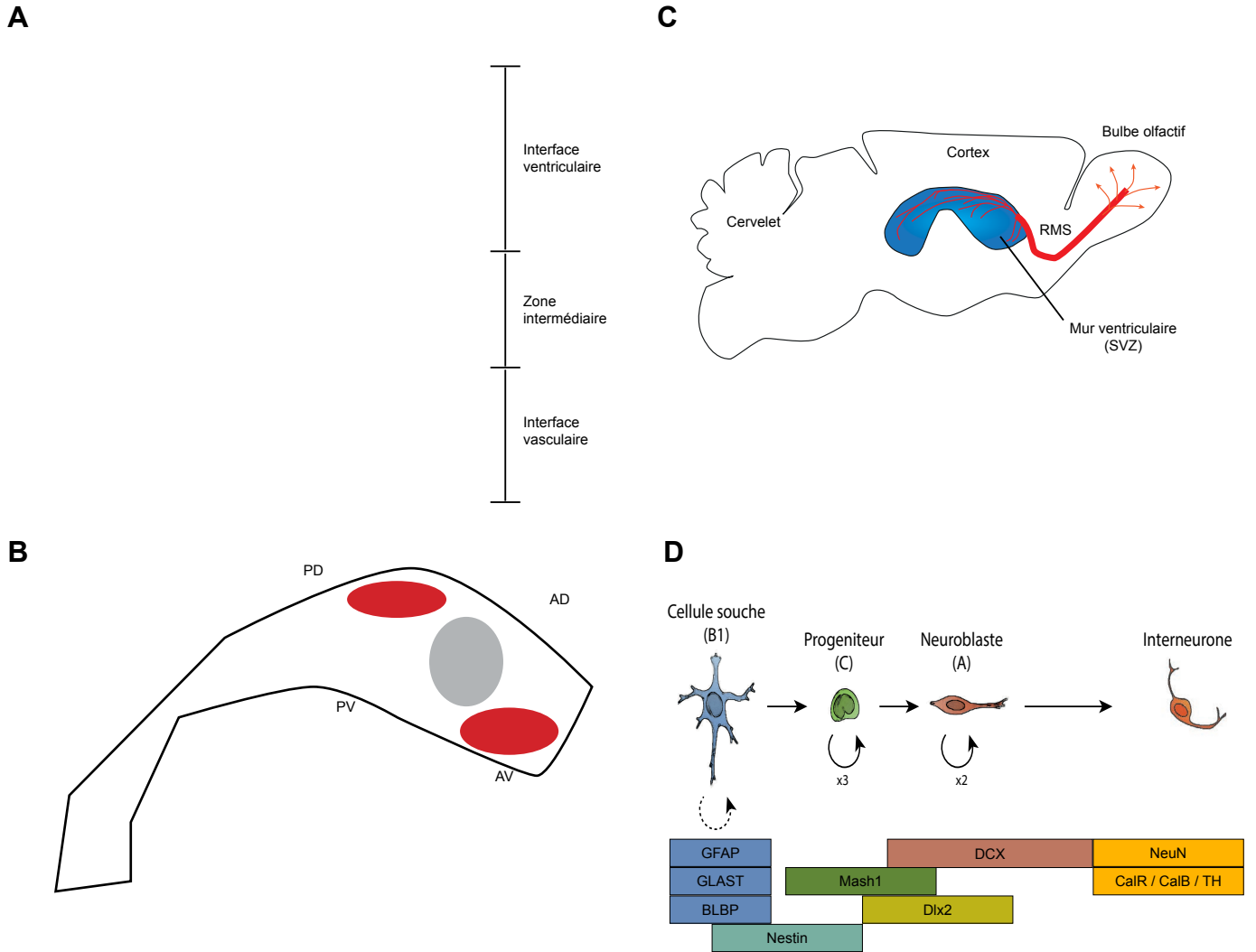


Figure 13 Organisation de la zone sous-ventriculaire et étapes cellulaires de la neurogenèse adulte.

A, Les cellules souches astrogliales de type B1 (bleu foncé) présentent un cil primaire au niveau du ventricule et un pied apical vers le système vasculaire. Elles génèrent des cellules B1a activées (cellules B1a). Les cellules B1a génèrent des progéniteurs transitoires (cellules C en vert) qui se différencient en neuroblastes (cellules A) qui migrent en dehors de la SVZ (cf. **C**). Cette *niche* sous-ventriculaire présente trois interfaces (indiquées sur la droite) à travers lesquelles les cellules B1 sont notamment en interaction avec les cellules endothéliales (Endo), les cellules épendymaires multicillées (cellules E1 et E2), l'innervation cholinergique (neurones chAT) et dopaminergique (réseau axonal en vert, 5HT). Figure issue de (Lim and Alvarez Buylla, 2014). **B**, La distribution et de la densité des contacts apicaux des cellules B1 au niveau de la surface ventriculaire du mur latéral (en haut) et médian (en bas) révèlent la présence de deux zones de forte densité dans la partie antéro-ventrale (AV) et postéro-dorsale (PD). La zone d'adhésion entre les deux murs est représentée en gris. Résultats issus de (Mirzadeh et al., 2008). **C**, Les neuroblastes générés par la SVZ migrent en chaîne et se rassemblent dans la partie antérieure de la SVZ pour former la RMS. Au niveau du BO, les neuroblastes se détachent et migrent radialement avant de se différencier en interneurones du BO. **D**, Schématisation des étapes cellulaires de la neurogenèse du bulbe olfactif. Certains marqueurs moléculaires caractéristiques de chaque étape sont indiqués, de même que les nombres moyens de division des cellules de type C et A.

L'identité des cellules souches de la SVZ a été démontrée grâce à l'injection dans le ventricule latéral d'un agent antiméitotique, l'Ara-C (cytosine-β-D-arabinofuranoside) (Doetsch et al., 1999). Cet agent permet l'élimination des cellules en division, telles que les cellules C et les neuroblastes, alors que de nombreuses cellules B1 survivent au traitement. En quelques jours après l'arrêt du traitement antiméitotique, ces cellules B1 restantes prolifèrent et régénèrent l'ensemble des types cellulaires de la séquence neurogénique (cellules B1 → cellules C → neuroblastes → neurones). Cette expérience a permis de montrer que les cellules B1 présentent des propriétés de cellule souche neurale (maintenance, prolifération et pluripotence) et sont bien à l'origine de la neurogenèse adulte du BO.

3.2 Caractéristiques des cellules souches de type B1

Les cellules B1 présentent une morphologie radiale caractéristique de cellule polarisée. Elles sont en contact avec le ventricule latéral du côté apicale et étendent un long prolongement basal qui interagit avec les vaisseaux sanguins (Figure 13A). La surface apicale (ventriculaire) des cellules B1 présente un cil primaire qui les distingue des cellules épendymaires multiciliées (Figure 13A) (Mirzadeh et al., 2008). Vu de face, le mur ventriculaire est donc constitué d'une mosaïque de cellules épendymaires entre lesquelles s'intercalent les prolongements des cellules B1. Cette disposition des cellules épendymaires autour des cellules B1 forme des motifs dit « en rosace ». La distribution de ces rosaces, et donc des cellules B1, n'est pas homogène : le mur ventriculaire présente des zones de forte densité de cellules souches, avec parfois une dizaine de contacts apicaux de cellule B1 différentes au niveau de la même rosace (figure 13B) (Mirzadeh et al., 2008).

Sur le plan moléculaire, les cellules B1 expriment une combinaison de marqueurs gliaux (p. ex. *GFAP*, *Glast* ou encore *BLBP*) et de marqueurs de progéniteurs neuraux (*Sox2*, *Nestin* et *CD133* entre autres) (figure 13D) (Ming and Song, 2011). Bien que de nombreux marqueurs des cellules B1 soient connus, aucun n'est spécifique de ces cellules. Par exemple, les marqueurs *Sox2* et *GFAP* sont également exprimés par les astrocytes environnants (Bonaguidi et al., 2011). Cette absence de *marqueur spécifique* impose l'utilisation de combinaison de plusieurs marqueurs moléculaires pour identifier ou isoler les cellules B1 (Beckervordersandforth et al., 2010).

Les cellules B1 sont présentes sous deux états dans la SVZ : **activé** et **quiescent**. A l'état quiescent elles se divisent rarement et ne génèrent pas de dérivés. Leur activation conduit à l'expression différentielle de certains gènes, tels que *Nestin*, *EGFR* et *BLBP*, à une augmentation de la prolifération et à la génération des dérivés neurogéniques (Giachino et al.,

2013; Codega et al., 2014). Cette modification de l'état des cellules B1 entre quiescence et activation s'effectuerait sous le contrôle de différentes voies de signalisation en provenance de la niche sous-ventriculaire.

3.3 Régulations de la neurogenèse au sein de la niche sous-ventriculaire

La SVZ est constitué d'une diversité de types cellulaires qui interagissent avec les cellules B1 et modulent leur activité : les cellules endothéliales du système vasculaire, les astrocytes non-neurogéniques (ou cellules de type B2), les cellules épendymaires, la microglie, les axones de neurones qui projettent vers la SVZ et enfin les progéniteurs générés par les cellules B1 elles-mêmes (cellules C et neuroblastes) (Figure 13A). Les cellules B1 sont ainsi soumises à la fois à des interactions cellulaires et à de nombreux facteurs solubles. Trois *interfaces* peuvent être distinguées (Figure 13A) (Lim and Álvarez-Buylla, 2014) :

- apicale / ventriculaire,
- intermédiaire,
- basale / vasculaire.

3.3.1 Interface ventriculaire et influence du liquide cébrospinal

Dans la zone apicale/ventriculaire, les cellules B1 sont en contact avec le LCS et les cellules épendymaires (Figure 13A). Le LCS contient de nombreux morphogènes (ex : BMPs, Wnts, SHH, acide rétinoïque, etc.) et facteurs de croissance (ex : IGF-2, FGF, etc.) capables de modifier le comportement des cellules souches (Lim and Álvarez-Buylla, 2014). Certaines de ces voies de signalisation, comme la signalisation SHH, semblent nécessiter la présence du cil primaire à la surface des cellules B1 (Tong et al., 2014b). Les cellules épendymaires participent également activement à la régulation de la niche, notamment en inhibant certaines signalisations en provenance du LCS. D'autre part, le battement de leurs cils permet d'orienter la circulation du LCS et affecte l'orientation de la migration des neuroblastes (Sawamoto et al., 2006).

3.3.2 Interface intermédiaire et influence des neurotransmetteurs

De nombreux systèmes de neurotransmetteurs sont impliqués dans le contrôle de l'activité de la niche, tels que les systèmes GABAergique (Acide γ -aminobutyrique), glutamatergique, dopaminergique, sérotoninergique ou encore cholinergique (Platel et al., 2010; Young et al., 2011).

Le neurotransmetteur **GABA** sécrété par les neuroblastes inhibe la prolifération et la différenciation des progéniteurs de la SVZ qui expriment son récepteur (GABA_AR). Ce

mécanisme permettrait aux neuroblastes d'effectuer un rétrocontrôle négatif sur leur propre production (Liu et al., 2005). En antagonisme à ce mécanisme, les cellules B1 et C sécrètent la protéine **DBI** (*Diazepam Binding Inhibitor Protein*) qui entre en compétition avec GABA pour se lier à son récepteur, et favorise la prolifération des cellules progénitrices (Alfonso et al., 2012).

La signalisation **glutamatergique**, potentiellement activée par certaines cellules astrogliales, aurait un effet positif sur la neurogenèse et assurerait notamment la survie et la migration des neuroblastes (Platel et al., 2010).

Des neurones de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale sécrètent de la **dopamine** au niveau de la SVZ. Celle-ci favoriserait la prolifération des progéniteurs en se liant au *D2-like receptor* présent à leur surface (Baker et al., 2004).

La **sérotonine** (5-HT) régule la prolifération des cellules de la SVZ et ainsi la neurogenèse. Étonnamment, l'innervation sérotoninergique en provenance du raphé forme un réseau d'axones en contact avec les cellules épendymaires et les cellules B1 dans la zone supra-épendymaire (Figure **13A**) (Tong et al., 2014a).

Enfin, l'innervation **cholinergique** depuis des neurones locaux exprimant la ChAT (*Choline Acetyl Transferase*) favorise la prolifération neurogénique (Figure **13A**) (Paez-Gonzalez et al., 2014).

3.3.3 Interface basale et influence du système vasculaire

Du côté basal, les cellules souches B1 établissent des contacts étroits avec le système vasculaire et répondent à des signaux sécrétés localement par les cellules endothéliales (Shen et al., 2004). À ce niveau, la barrière hémato-encéphalique semble être plus perméable, ce qui permet à des facteurs systémiques en provenance du système vasculaire de moduler le fonctionnement de la niche en conditions normale et pathologiques (Shen et al., 2008; Sawada et al., 2014).

L'importance de ces facteurs circulants sur l'activité neurogénique a été mise en exergue récemment par une étude investiguant la diminution de l'activité neurogénique de la SVZ durant le vieillissement. Cette étude montre que lorsque certains facteurs sanguins du jeune animal sont injectés chez l'animal âgé, l'activité neurogénique chez celui-ci est restaurée à un niveau similaire au jeune adulte et ses capacités olfactives sont grandement améliorées (Katsimpardi et al., 2014).

En résumé, l'activité de la niche sous-ventriculaire et en particulier des cellules B1 est susceptible d'être régulée par des facteurs d'origines diverses (rétrocontrôle, activité neuronale, situation pathologique, comportement, vieillissement, etc.). Ces facteurs sont susceptibles d'agir à différents niveaux de la niche (ventriculaire, intermédiaire, vasculaire) et d'influer sur une variété de mécanismes (ex : activation/quiescence, prolifération, différenciation, migration, survie, etc.). L'activité de la niche est également susceptible d'agir sur le type des cellules générées par les cellules B1.

3.4 Diversité des neurones générés au niveau du bulbe olfactif

Les cellules souches de la SVZ adulte génèrent au moins six types **d'interneurones** du BO qui se distinguent par leurs morphologies, la localisation de leur soma et l'expression de certains marqueurs (Figure 14). Une majorité de ces interneurones s'intègre dans la couche granulaire où ils forment des cellules granulaires profondes et superficielles, dont certaines expriment la Calretinin (CalR+). Une plus faible proportion de ces interneurones migre jusqu'à la couche glomérulaire et se différencie en une large diversité d'interneurones périglomérulaires. Trois marqueurs indépendants sont connus pour ces sous-populations d'interneurones périglomérulaires : CalR, Calbindin (CalB) et Tyrosine Hydroxylase (TH) (Lim and Álvarez-Buylla, 2014). A l'exception des interneurones TH+ qui sont des neurones mixtes dopaminergiques/GABAergiques, ces interneurones adultes du BO sont essentiellement GABAergique. Cependant, plusieurs études décrivent que la SVZ adulte donne également naissance à une population d'interneurones juxta-glomérulaires glutamatergiques (Brill et al., 2009; Azim et al., 2014). Enfin, d'autres populations neuronales minoritaires s'intégreraient aux niveaux des couches mitrale et plexiformes (Figure 14) (Merkle et al., 2013).

La production de ces différents types d'interneurones du BO n'est ni constante dans le temps, ni restreinte à l'âge adulte ; elle évolue au contraire de façon dynamique durant l'embryogenèse, le développement postnatale et la vie adulte (De Marchis et al., 2007; Batista-Brito et al., 2008; Li et al., 2011). Par exemple, les neurones périglomérulaires CalB+ ont un pic de production durant l'embryogenèse et sont générés en plus faible quantité chez l'adulte. A l'inverse, les neurones CalR+ sont essentiellement générés après la naissance. Similairement, les neurones granulaires générés durant la période périnatale sont majoritairement des neurones granulaires de la couche superficielle, alors qu'à l'âge adulte la majorité des nouveaux neurones se différencient en neurones granulaires des couches

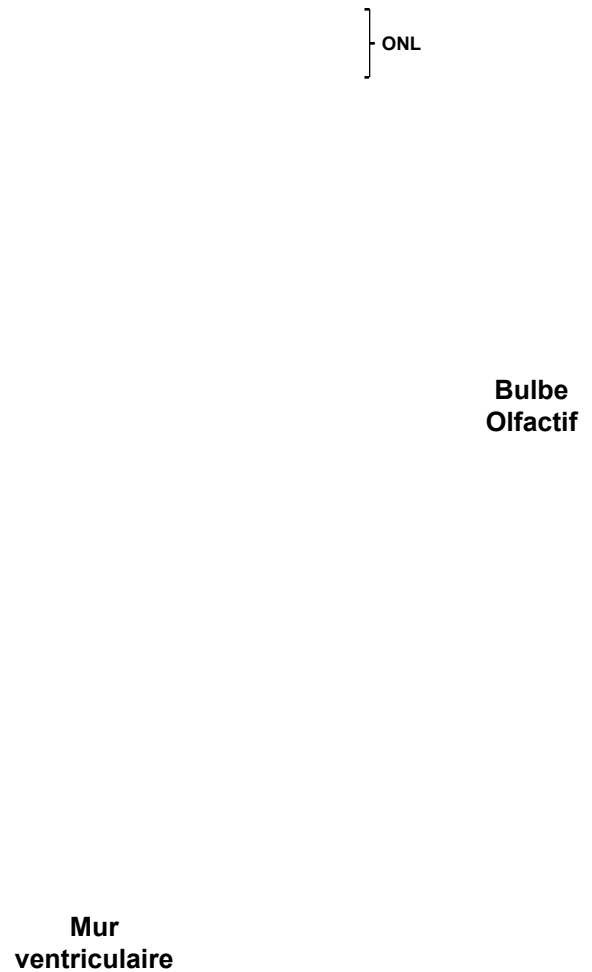


Figure 14 La diversité des neurones générés dans le bulbe olfactif adulte reflète une régionalisation des cellules souches de la SVZ.

Cette vue oblique du cerveau murin montre en transparence la régionalisation du mur latéral. Chaque région (indiquée en couleur) génère préférentiellement un type particulier d'interneurone au niveau du bulbe olfactif, dont une vue en coupe est présentée dans la partie haute de la figure. Les différentes populations d'interneurones sont caractérisées par la localisation du corps cellulaire, la forme de leurs dendrites et l'expression de certains marqueurs moléculaires. Les cellules granulaires (GC) peuvent être divisées en cellules profondes (*deep GC*) et superficielles (*superficial GC*), dont certaines expriment la Calretinin (CalR+ GC). Les cellules periglomerulaires (PGC) sont caractérisées par l'expression de la Calretinin (CalR+PGC), de la Calbindin (CalB+PGC) ou de la Tyrosine hydroxylase (TH+PGC). Plus récemment, quatre sous-types d'interneurones (types 1 à 4), générés depuis la partie antéro-ventrale de la SVZ, ont été caractérisés. Figure adaptée de (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Légende des différentes zones : RMS, *rostral migratory stream* ; GRL, couche des cellules granulaires ; IPL, couche plexiforme interne ; ML, couche des cellules mitrales ; EPL, couche plexiforme externe ; GL, couche glomérulaire ; ONL, olfactory nerve layer.

profondes (Lemasson, 2005; Kelsch et al., 2007). D'autre part, certains types d'interneurones comme les interneurones Parvalbumine⁺ de la couche plexiforme externe ne sont produits que durant la période périnatale et ne sont pas produits par la SVZ adulte (Batista-Brito et al., 2008; Li et al., 2011).

Cette évolution de la diversité des types cellulaires générés au niveau du BO reflète une évolution de l'identité et du potentiel des cellules souches présentes dans la zone ventriculaire embryonnaire (glie radiaire) puis sous-ventriculaire (cellule B1) durant le développement et l'âge adulte (Díaz-Guerra et al., 2013).

3.5 Liens entre origine, régionalisation et potentiels des cellules souches de la zone sous-ventriculaire adulte

Le traçage de populations postnatales de glies radiaires a permis de montrer que celles-ci sont à l'origine des cellules souches de la SVZ adulte (Figure 7D). Après la naissance, certaines glies radiaires subissent des changements morphologiques (p. ex. rétraction de leur extension apicale) et moléculaires (p. ex. l'extinction de *RC2* et l'activation de *GFAP*) pour se transformer en cellules souches de type B1 de la SVZ adulte (Merkle et al., 2004). La majorité des cellules souches adultes proviennent de glies radiaires de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) et s'établissent dans le mur latéral des ventricules latéraux chez l'adulte (Merkle et al., 2004). Cependant, les glies radiaires du pallium, du septum et de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) génèrent également une partie des cellules souches adultes des murs dorsal, médian et ventral, respectivement (Kohwi et al., 2007; Ventura and Goldman, 2007; Alvarez-Buylla et al., 2008). Enfin, des cellules souches dérivées des glies radiaires du cerveau antérieur (bordant le ventricule olfactif embryonnaire) s'intègrent au niveau de la RMS dans la partie antérieure de la SVZ (Alonso et al., 2008).

Les expériences de traçage *in vivo* de ces différentes populations de cellules souches montrent qu'elles ne génèrent pas les mêmes types de dérivés au niveau du BO (Merkle et al., 2007; 2013). Par exemple, certaines cellules B1 dorsales génèrent spécifiquement des cellules granulaires superficielles et des cellules périglomérulaires dopaminergiques (TH⁺). À l'inverse, les cellules B1 ventrales génèrent des cellules granulaires profondes et des cellules périglomérulaires CalB⁺ (Merkle et al., 2007). En plus des neurones, la partie dorsale de la SVZ adulte génère des oligodendrocytes du corps calleux (Menn et al., 2006). La SVZ est ainsi divisée en différents **domaines spatiaux** de progéniteurs qui ont chacun un potentiel de différenciation spécifique (Figure 14) (Lim and Álvarez-Buylla, 2014).

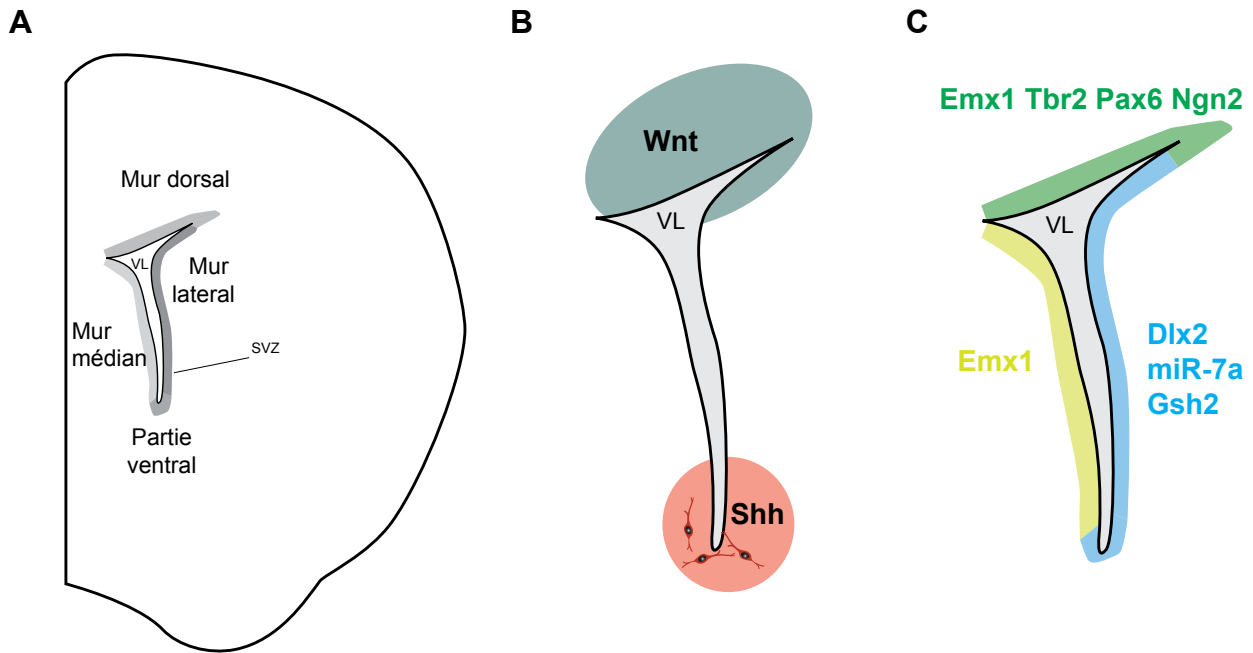


Figure 15 Régionalisations de la zone sous-ventriculaire adulte.

A, La zone sous-ventriculaire couvre l'ensemble des murs du ventricule latéral (ici vue en coupe coronale). **B**, Deux signalisations par des morphogènes ont été identifiées dans la SVZ : Sonic hedgehog (Shh) est sécrété depuis certains neurones situés dans la partie ventrale du mur et Wingless (Wnt) est sécrété depuis une source non identifiée dans la partie dorsale de la SVZ. **C**, Plusieurs gènes déterminant pour l'identité des précurseurs neuronaux présentent une expression régionalisée au sein de la SVZ. SVZ, zone sous-ventriculaire ; VL, ventricule latéral. Schéma adapté de (Sequerre, 2014) .

Il est intéressant de noter qu'alors que les cellules de la glie radiaire du pallium génèrent exclusivement des neurones glutamatergiques durant l'embryogenèse (Figure 5), les cellules B1 auxquelles cette zone donne naissance sont capables de générer des interneurons GABAergiques (Kohwi et al., 2007; Ventura and Goldman, 2007). Cette observation suggère que le potentiel des cellules souches d'un domaine donné est susceptible d'être redéfini dans le temps et notamment durant la période de transition entre glias radiaires et cellules B1.

Comment est contrôlée et codée cette régionalisation du potentiel des cellules B1 ? Plusieurs expériences de transplantation suggèrent que ces informations spatiales et temporelles sont **intrinsèques** aux progéniteurs neuraux de la SVZ. Lorsque des progéniteurs isolés à partir d'une partie du mur ventriculaire sont transplantés dans une zone différente (greffe hétérotopique) ou à une période différente (greffe hétérochronique) de la SVZ, ils continuent à générer des dérivés caractéristiques de leur zone d'origine (Kelsch et al., 2007; Kohwi et al., 2007; Merkle et al., 2007). Cependant, d'autres travaux récents indiquent que cette régionalisation de la SVZ est pourtant sous le contrôle permanent de gradients de morphogène et donc de facteurs **extrinsèques** (Figure 15B). D'une part, des neurones localisés dans la partie ventrale du mur ventriculaire secrètent du SHH. La signalisation SHH est nécessaire et suffisante pour spécifier l'identité des cellules souches neurales dans la partie ventrale de la SVZ. Elle contrôle ainsi la production des neurones périglomérulaires CalB-positif et des neurones granulaires profonds (Ihrle et al., 2011). D'autre part, la signalisation Wnt, émise depuis une source non identifiée dans la partie dorsale du mur, est nécessaire à la génération d'oligodendrocytes et de neurones glutamatergiques (Azim et al., 2014). Ces deux signalisations pourraient être à l'origine de l'expression régionalisée à travers la SVZ des facteurs de transcription et microARN (miARN) qui contrôlent la spécification des différents types de neurones du BO et dont je donne ici quelques exemples (Figure 15C) :

- *Neurog2*, *Tbr2* et *Tbr1* sont exprimés dans la partie dorsale de la SVZ et sont notamment impliqués dans la neurogenèse glutamatergique (vGluT2+)(Brill et al., 2009).
- Le facteur de transcription Pax6 est également présent dans la partie dorsale et est impliqué dans la spécification des neurones périglomérulaires dopaminergiques (neurones TH+) et des neurones granulaires superficiels. De façon intéressante, l'ARNm du gène *Pax6* est présent dans la partie latérale du mur de façon plus étendue que la protéine Pax6 mais la présence d'un gradient ventro-dorsal du miARN *miR-7a* est responsable de l'inhibition de la traduction de la protéine dans la partie ventrale du mur (Kohwi, 2005; de Chevigny et al., 2012).

- *Emx1* est exprimé dans la partie dorsale et septale de la SVZ et serait impliqué dans la spécification des neurones granulaires superficiels et les interneurones périglomérulaires CalR+ (Kohwi et al., 2007; Young et al., 2007).
- *Gsh2* est exprimé dans la partie latérale du mur et serait lié à la production des neurones CalB-positifs (Young et al., 2007). *Dlx2* est également exprimé dans la partie latérale du mur mais ne semble pas impliqué dans la génération d'un type particulier de neurone.
- Plus récemment, l'équipe d'Álvarez-Buylla a caractérisé les zones d'origine de quatre nouveaux types d'interneurones du BO présents entre la couche granulaire et la couche plexiforme externe (Merkle et al., 2013). Leurs résultats indiquent qu'il existe des micro-domaines aux potentiels très restreints au sein de la SVZ antérieure ventrale. Cette zone, au croisement entre le septum et le striatum serait régionalisée par l'expression de multiples facteurs de transcription (*Gli1*, *Nkx2.1*, *Nkx6.2*, *Zic*, etc.).

L'ensemble de ces résultats suggère que le potentiel des cellules souches de la SVZ est contrôlé de façon dynamique dans le temps et l'espace. Ce contrôle dépendrait dans un premier temps de facteurs extrinsèques (morphogène), avant d'être encodé par des mécanismes intrinsèques qui permettent aux progéniteurs neuronaux de conserver leurs identités durant leur migration jusqu'au BO. L'étape cellulaire durant laquelle se fait cet encodage intrinsèque reste encore à déterminer (cellules B1 quiescente, B1 activée, C ?) (Lim and Álvarez-Buylla, 2014).

3.6 Rôle physiologique de la neurogenèse de la SVZ

Le bulbe olfactif adulte des rongeurs reçoit un apport journalier de milliers de nouveaux interneurones. Cependant, seule une faible proportion d'entre eux s'intègre dans le circuit olfactif préexistant pour devenir des interneurones granulaires (95%) et périglomérulaires (3% environ) (Lazarini and Lledo, 2011). Le rôle physiologique de cet apport continu n'est pas encore complètement décrypté.

L'information olfactive provient des neurones récepteurs olfactifs situés dans l'épithélium olfactif de la cavité nasale. Ces neurones périphériques forment des synapses glutamatergiques avec les cellules mitrales au niveau des glomérules du BO (Figure 16). Les cellules mitrales transmettent ensuite cette information vers le cortex olfactif. Cependant, avant d'atteindre le cortex, l'information olfactive est traitée localement par le biais des interneurones granulaires et périglomérulaires. En retour, les structures centrales modifient l'activité du réseau du BO en fonction du contexte comportemental de l'animal au moment du

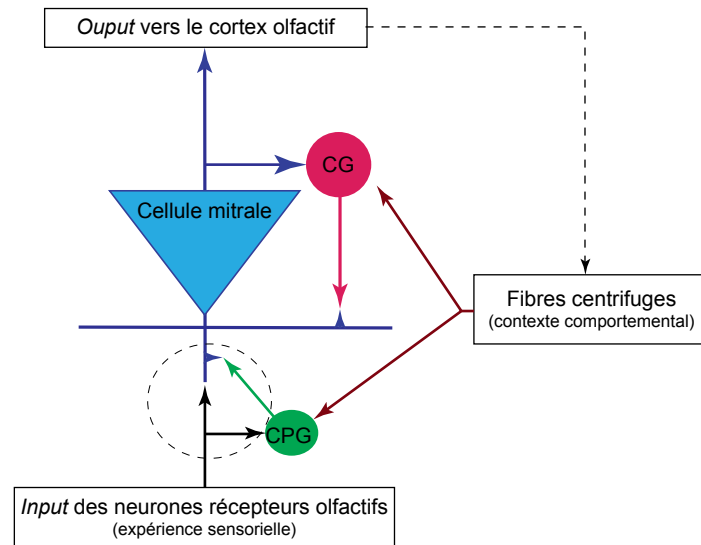


Figure 16 Schéma simplifié du circuit impliqué dans le traitement de l'information olfactive.

Les interneurons générés durant la vie adulte (CG et CPG) interviennent dans le traitement de l'information olfactive effectué par les cellules mitrales du BO. Ils reçoivent eux-même des synapses en provenance des neurones récepteurs olfactifs au niveau du glomérule (pointillés), des cellules mitrales (synapses dendro-dendritiques) et des axones en provenance de structures centrales (fibres centrifuges). CG, cellule granulaire ; CPG, cellule périglomérulaire. Schéma adapté de (Lazarini and Lledo, 2011)

stimuli (ex : apprentissage, attention, récompense, etc.). Ce rétrocontrôle passe par la modulation de l'activité des interneurons du BO (Figure 16). Les cellules périglomérulaires forment essentiellement des synapses GABAergique ou dopaminergiques au niveau de quelques glomérules et interagissent avec les dendrites des cellules mitrales et des neurones récepteurs olfactifs. Les cellules granulaires sont des neurones GABAergiques, dépourvue d'axone qui forment des synapses dendro-dendritique avec les neurones de projection du BO (*mitral cells* et *tufted cells*). Elles favorisent notamment la synchronisation des cellules mitrales et les oscillations nécessaires à l'activité du réseau (Lazarini and Lledo, 2011). Quel rôle joue l'apport continu de cellules granulaires et périglomérulaires dans le fonctionnement de ce réseau ?

Les neurones immatures présentent une période de maturation et de synaptogenèse d'environ 4 semaines. Durant ce temps certains vont s'intégrer dans le circuit et la majorité sera éliminée. Similairement à la neurogenèse du GD, lors de leur intégration, les neurones immatures reçoivent des *inputs* synaptiques avant de former des *outputs* synaptiques. Cette période coïncide avec une *période critique* de plasticité synaptique (potentialisation à long terme facilitée) et de compétition pour la survie entre les nouveaux neurones. Ces propriétés rendent les nouveaux neurones beaucoup plus sensibles aux stimuli olfactifs par rapport aux neurones matures. Leur capacité à survivre et, plus surprenant, leurs caractéristiques fonctionnelles dépendraient de l'activité du réseau – donc de l'expérience olfactive vécue par l'animal – au moment de leur intégration (Livneh et al., 2014). Selon cette hypothèse, le flux des nouveau neurones fourni un apport continu de nouvelle pièce au réseau olfactif. Celui-ci ne conserve que les éléments nécessaires et les adaptent en fonctions de l'expérience olfactive de l'animal.

D'un point de vue fonctionnel, ce flux de nouveaux interneurons apparait essentiels pour la discrimination, l'apprentissage et la mémorisation des odeurs. Par ce biais, la neurogenèse adulte intervient dans la mémoire olfactive à court terme, le conditionnement olfactif par la peur, ainsi que l'apprentissage d'une mémoire olfactive associative à long terme (ex : odeur = récompense) (Lazarini and Lledo, 2011). De plus, elle semblerait impliquée dans le contrôle des comportements liés aux phéromones, comme l'accouplement, la maternité et la reconnaissance sociale (Mak et al., 2007).

3.7 Présence d'une neurogenèse sous-ventriculaire chez l'Homme ?

À l'inverse des rongeurs, le BO humain ne présente pas de neurogenèse significative à l'âge adulte (Bergmann et al., 2012). Chez le nourrisson il semble exister un chemin de migration de neurones immature vers le BO et le cortex, mais cette migration s'étiolo pendant la première année de vie et ne persiste pas chez l'adulte (Sanai et al., 2011). Malgré une architecture cellulaire distincte, la SVZ humaine contient des cellules astrogliales capables de proliférer *in vivo* et présentant des propriétés de progéniteurs multipotents *in vitro* (Sanai et al., 2004).

Quelle pourrait être la fonction de ces progéniteurs si la neurogenèse n'est pas nécessaire au fonctionnement du BO chez l'homme ? Les études de datation au ^{14}C (Figure 12) ont récemment révélé que chez l'homme de nouveaux interneurons apparaissent au niveau du striatum, une structure attenante à la SVZ (Ernst et al., 2014). Ce renouvellement des neurones du striatum semble altéré par la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative qui affecte principalement les neurones du striatum. Les auteurs suggèrent donc que la SVZ humaine fournit de nouveaux interneurons qui migrent dans le striatum et non vers le BO (Ernst et al., 2014). Cette hypothèse reste controversée car un suivi de la migration des neuroblastes (cellules Dcx+ Sp8+), suggère l'absence de lien cellulaire entre la SVZ et la neurogenèse du striatum chez l'homme (Wang et al., 2014; Ernst and Frisén, 2015).

4 L'hypothalamus, une troisième niche neurogénique ?

La présence de neurogenèse adulte du SNC est un caractère différemment conservé chez l'ensemble des vertébrés (Barker et al., 2011). Les poissons, amphibiens et reptiles possèdent de multiples centres neurogéniques adultes (Figure 17). Chez les oiseaux, seules les zones progénitrices péri-ventriculaires génèrent des nouveaux neurones mais ceux-ci se disséminent ensuite dans plusieurs structures du cerveau. Chez les mammifères adultes, la neurogenèse perdure principalement depuis la SVZ et la SGZ, dans des proportions différentes selon les espèces. Par exemple, chez les primates et l'Homme l'activité neurogénique n'a été confirmée qu'au niveau de la SGZ. Il existe donc une différence de capacité neurogénique pour chaque structure au cours de l'évolution.

Chez les rongeurs, la présence de neurogenèse adulte en dehors des deux niches principales a été suggérée mais reste controversée pour de nombreuses structures (septum, striatum, néocortex, cortex piriforme, tubercule olfactif, substance noire, moelle épinière ou encore nerf optique) (Gould, 2007). Différentes études ont également décrit une neurogenèse dite « réactive » en condition pathologique ou après lésion du tissu nerveux (Gould, 2007; Sirko et al., 2013). Un accident vasculaire cérébral (*stroke*) provoque par exemple l'activation d'un programme neurogénique latent au sein de certains astrocytes du striatum (Magnusson et al., 2014). Ces études suggèrent que beaucoup de structures ont conservé une capacité neurogénique, peu active en condition physiologique mais qui est susceptible d'être « réveillée » en cas de lésion. Parmi ces structures, la zone ventriculaire de l'hypothalamus semble émerger comme un troisième site de neurogenèse adulte à part entière (Rojczyk-Gołębiewska et al., 2014; Sousa-Ferreira et al., 2014).

4.1 Fonctions, développement et organisations de l'hypothalamus

L'hypothalamus exerce plusieurs fonctions homéostatiques nécessaires à la survie de l'organisme en agissant sur le système nerveux autonome et sur le système endocrine. Il interagit également avec de nombreuses structures corticales et différents systèmes sensoriels. Il régit les rythmes circadiens, la prise de nourriture, l'homéostasie énergétique et la thermorégulation de l'organisme. Il est requis pour différentes réponses émotionnelles et instinctives et impliqué dans les comportements sociaux, sexuels, reproducteurs et parentaux (Saper, 2006).

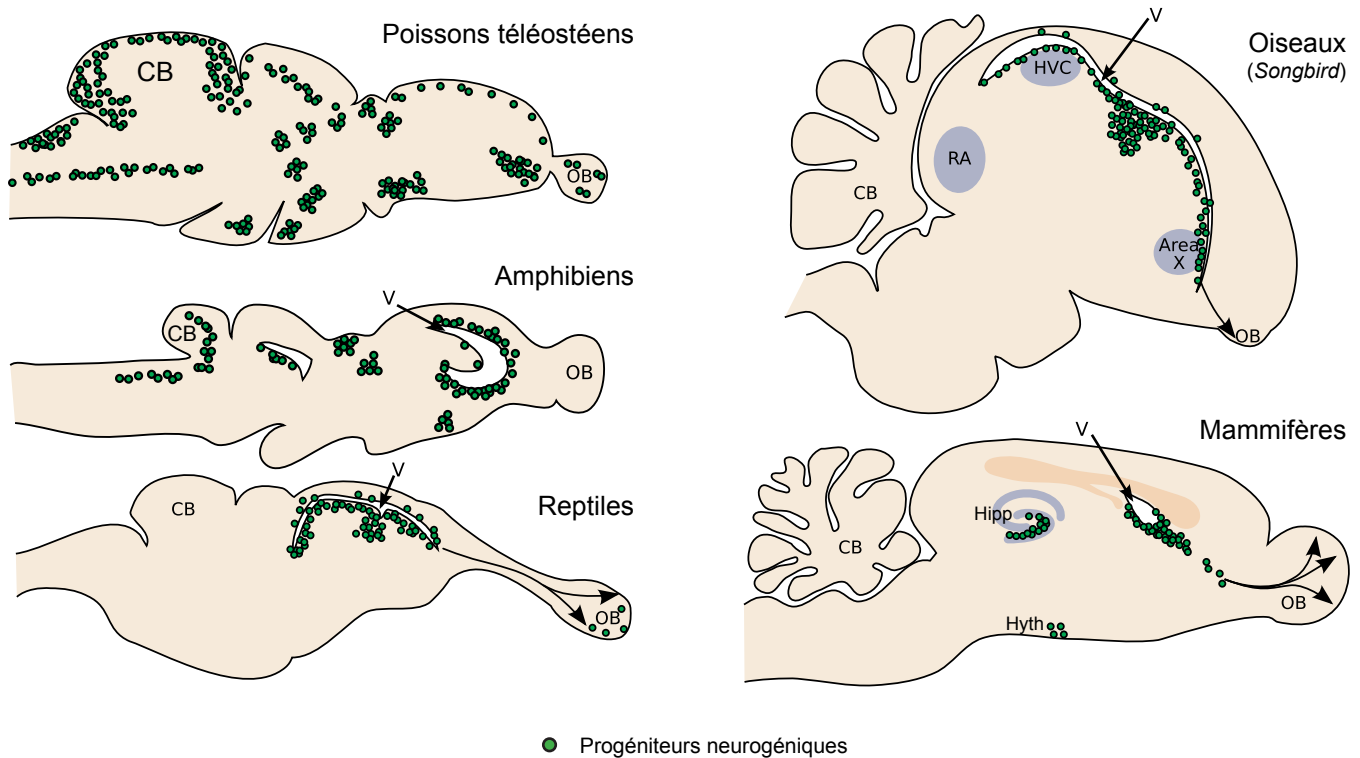


Figure 17 Evolution des zones neurogéniques chez les vertébrés.

Cette vue sagittale schématisée des cerveaux de vertébrés montre la localisation des précurseurs capables de proliférer et de générer des neurones dans le cerveau adulte. Les poissons et les amphibiens présentent de nombreuses populations neurogéniques. La neurogenèse adulte chez les reptiles et les oiseaux est restreinte aux zones ventriculaires mais les cellules générées se disséminent ensuite à travers le télencéphale. Chez le *songbird* cette neurogenèse est impliquée dans l'apprentissage du chant. Enfin, chez les mammifères (ici rongeurs) les cellules neurogéniques ne sont présentes que dans la SVZ, la SGZ et à moindre mesure au niveau de l'hypothalamus. Légende : Area X, aire impliquée dans l'apprentissage musicale chez l'oiseau ; CB, cervelet ; Hipp, hippocampe ; HVC, *higher vocal center* ; Hyth, hypothalamus ; OB, bulbe olfactif ; V, ventricule latéraux ; RA, robust nucleus of the arcopallium. Figure modifiée depuis (Barker et al., 2011)

Durant l'embryogenèse, l'hypothalamus se forme à la jonction entre le diencéphale et le télencéphale dans la partie rostro-ventral du neuroépithélium, sous le contrôle notamment de la signalisation SHH. A l'instar du pallium, le neuroépithélium de l'hypothalamus est régionalisé par l'expression de différents facteurs de transcription qui divisent cette structure en de multiples domaines de progéniteurs neuronaux (révisé par (Blackshaw et al., 2010)). La génération des différentes populations de neurones des noyaux de l'hypothalamus se fait alors par plusieurs vagues successives de neurogenèse s'étendant, chez les rongeurs, de la fin de la neurulation aux premières semaines après la naissance (Markakis, 2002; Blackshaw et al., 2010; Alvarez-Bolado et al., 2012; Sousa-Ferreira et al., 2014).

Sur le plan anatomique, l'hypothalamus adulte est un ensemble de noyaux situé sous le thalamus et traversé en son centre par le 3^{ème} ventricule. Il est divisé selon l'axe rostro-caudal en 4 régions : pré-optique, antérieure, tubérale et mammillaire (Figure 18). De même, ses noyaux sont régionalisés selon un axe médio-latéral en trois zones : périventriculaire, médiale et latérale. Les noyaux arqué, ventro-médial et dorso-médial de la partie médio-basale de l'hypothalamus (MBH) sont organisés autour de la partie ventrale du 3^{ème} ventricule (Figure 18). A ce niveau, l'architecture cellulaire de la zone ventriculaire est différente de celle de la SVZ. Elle est constituée dans sa partie dorsale d'une couche monocellulaire de cellules épendymaires (cellules cuboïdes et ciliées) et dans sa partie ventrale par des cellules épendymogliales particulières, appelées **tanycytes**, qui jouent un rôle prépondérant dans le fonctionnement du MBH.

4.2 Les tanycytes : diversité et fonctions

Les tanycytes (du grec *tanus*: allongé) sont des cellules polarisées qui présentent un corps cellulaire bordant le ventricule et un unique prolongement s'étendant vers le parenchyme et établissant des contacts avec le système vasculaire et les neurones du MBH (Figure 18). Les tanycytes proviennent de la différenciation après la naissance de certaines glies radiaires situées à la base du 3^{ème} ventricule. En plus de leur morphologie, les tanycytes partagent avec la glie radiaire l'expression de certains marqueurs comme *Nestin*, *Vimentin*, *Sox2*, *RC1* et *GLAST* (Rodríguez et al., 2005).

Quatre populations de tanycytes peuvent être identifiées sur la base de leurs morphologies, leurs positions dorso-ventrale dans le mur ventriculaire et les structures vers lesquelles ils projettent (Figure 18) (Rodríguez et al., 2005) :

Vue parasagittale de l'hypothalamus

Vue coronale au niveau de l'hypothalamus médiobasal

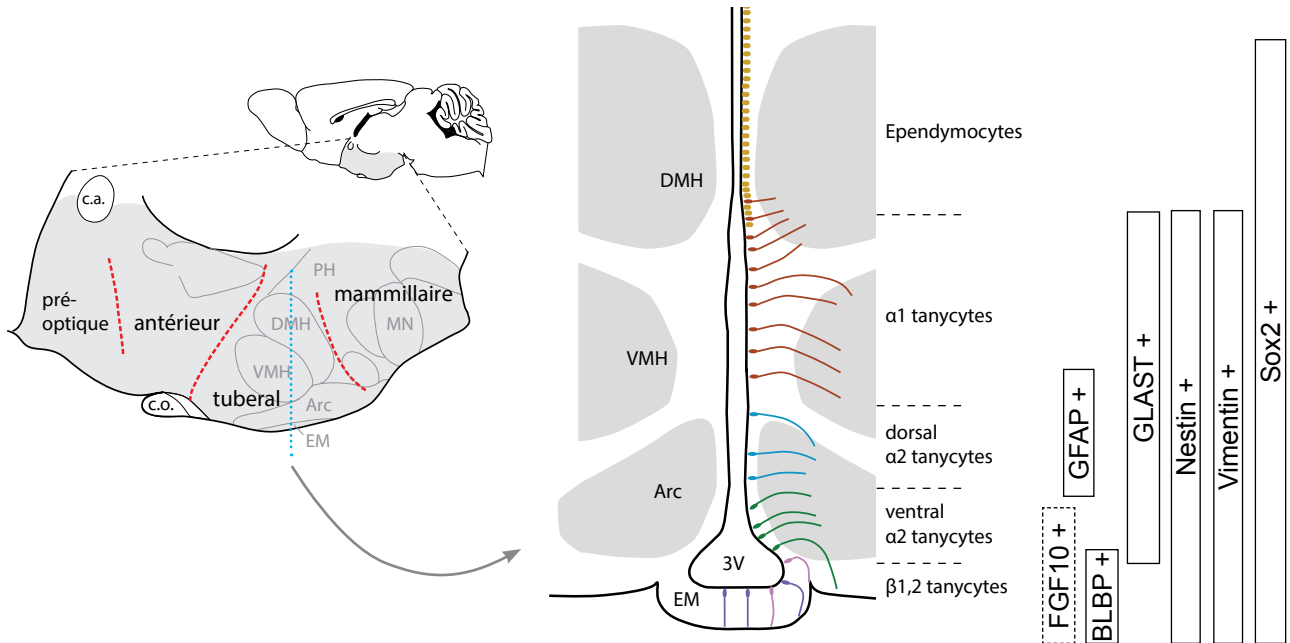


Figure 18 Organisation de l'hypothalamus et régionalisation de la zone ventriculaire du 3^{ème} ventricule.

L'hypothalamus est localisé dans la partie ventrale du cerveau (schéma de gauche). Il est divisé en 4 régions selon l'axe antéro-postérieur (traits rouges) et composé de différents noyaux (trait gris). Au niveau de l'hypothalamus tubéral (trait bleu), la zone ventriculaire du 3^{ème} ventricule (représentée en coupe sur le schéma de droite) est bordée par différentes populations régionalisées de tanycytes qui projettent chacune vers un noyau différent. Certains marqueurs de ces sous-populations sont indiqués à droite. Légende : 3V, 3^{ème} ventricule ; Arc, noyau arqué ; c.a., commissure antérieure ; c.o., chiasma optique ; DMH, noyau dorsomédial de l'hypothalamus ; EM, éminence médiane ; MN, *mammillary nuclei* ; VMH, Noyau ventromédial de l'hypothalamus

- les tanocytes α_1 bordent les noyaux ventro-médian et dorso-médian de l'hypothalamus et projettent vers ces noyaux ;
- les tanocytes α_2 se situent au niveau du noyau arqué et projettent vers cette structure ;
- les tanocytes β_1 sont principalement situés au niveau des invaginations du récessus infundibulaire et projettent vers les parties latérales de l'éminence médiane ;
- les tanocytes β_2 bordent la base de l'éminence médiane et contactent les capillaires du système porte de cette structure.

Les tanocytes $\alpha_{1,2}$ assurent le contact entre le LCS circulant au niveau du 3^{ème} ventricule et les neurones et vaisseaux du MBH, alors que les tanocytes $\beta_{1,2}$ assurent le contact entre le LCS et le système porte sanguin de l'éminence médiane. A ce niveau, les cellules endothéliales sont fenêtrées ce qui facilite le passage des molécules présentes dans la circulation vers les tanocytes $\beta_{1,2}$. (Langlet, 2014).

Cette localisation particulière suggère un rôle des tanocytes en tant que relais entre le LCS du 3^{ème} ventricule et la signalisation neuroendocrine de l'hypothalamus. Ces cellules sont en effet capables de moduler l'activité neuronale, de détecter des signaux chimiques au niveau du LCS (p. ex. glucose, hormones, facteurs de croissance) et de permettre le passage des signaux métaboliques de la périphérie vers le MBH (Balland et al., 2014). Grâce à ces différentes capacités, les tanocytes assurent par exemple une fonction centrale dans les différents niveaux de la réponse adaptative du MBH face au dérèglement de la balance énergétique (Langlet, 2014). Nous allons voir que ces cellules constituent également une population de précurseurs neuraux du MBH.

4.3 Démonstration de la présence de cellules souches et de neurogenèse dans l'hypothalamus

La capacité à former des neurosphères *in vitro* est une des caractéristiques primordiales des structures abritant des cellules souches (Figure 7). En 2005, une étude révèle que l'hypothalamus des rongeurs est une structure *neurosphèrogénique*, capable de former *in vitro* des neurosphères qui conservent un potentiel de différenciation en cellules neuronales et gliales (Xu et al., 2005; Li et al., 2012; Robins et al., 2013a). Les chercheurs ont alors émis l'hypothèse que les tanocytes, de par leurs caractéristiques semblables aux cellules de glies radiaires, constituent les cellules souches de l'hypothalamus à l'origine de ces neurosphères et pourraient être une source de nouveaux neurones *in vivo*. Ils réussirent à mettre en évidence

cette neurogenèse adulte de l'hypothalamus par l'utilisation d'un adénovirus GFP-recombinant : injecté *in vivo* dans le système ventriculaire de rats âgés de 2 mois, cet adénovirus infecte les cellules en division de la zone ventriculaire du MBH et induit l'expression permanente de la GFP par ces cellules et leurs dérivés. Deux semaines après injection, les auteurs ont observé des neurones GFP-positifs nouvellement formés au niveau du parenchyme, signe d'une neurogenèse adulte en provenance de la zone ventriculaire du MBH (Xu et al., 2005).

Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses expériences montrant l'incorporation de BrdU dans des cellules neuronales nouvellement formées chez l'adulte (Pencea et al., 2001; Kokoeva, 2005; Xu et al., 2005; Lee et al., 2012; Li et al., 2012; Haan et al., 2013; Robins et al., 2013a; 2013b). Notamment, l'injection de BrdU directement dans le système ventriculaire (injection intra-cérébro-ventriculaire, i.c.v.) (Figure 19) permet d'observer des cellules BrdU+ présentant des caractéristiques moléculaires de progéniteurs (Sox2+), neuroblastes (DCX+), neurones (HuC/D+, NeuN+), oligodendrocytes (Olig2+) et astrocytes (GFAP+) matures dans le parenchyme quelques temps après injection (de quelques semaines à plusieurs mois selon les publications) (Kokoeva, 2005; Li et al., 2012).

Ces différents résultats montrent qu'en condition normale, l'hypothalamus présente une neurogenèse, oligodendrogenèse et astrogenèse continues. La neurogenèse semble cependant moins fréquente et plus lente que dans la SVZ et SGZ. L'identification de la cellule souche à l'origine de cette neurogenèse fait encore débat. Ces discordances à travers la littérature suggèrent la présence de multiples précurseurs, à la fois aux niveaux de la zone ventriculaire et du parenchyme de l'hypothalamus.

4.4 Différentes cellules progénitrices dans l'hypothalamus ?

4.4.1 Tanycytes β

L'administration périphérique de BrdU (via la nourriture, l'eau ou par de multiples injections par voie intra-péritonéale) conduit à une incorporation efficace de BrdU au niveau des tanycytes β_2 de l'éminence médiane à la base du 3^{ème} ventricule (Lee et al., 2012; Haan et al., 2013). Cette administration permet également d'observer, à plus long terme, des neurones (identifiés par le marqueur HuC/D) marqués par le BrdU au niveau de l'éminence médiane. De plus, le traçage des tanycytes β_2 au moyen de la lignée *Nestin::CreERT2* conduit à l'apparition progressive de cellules HuC/D-positives tracées au niveau de

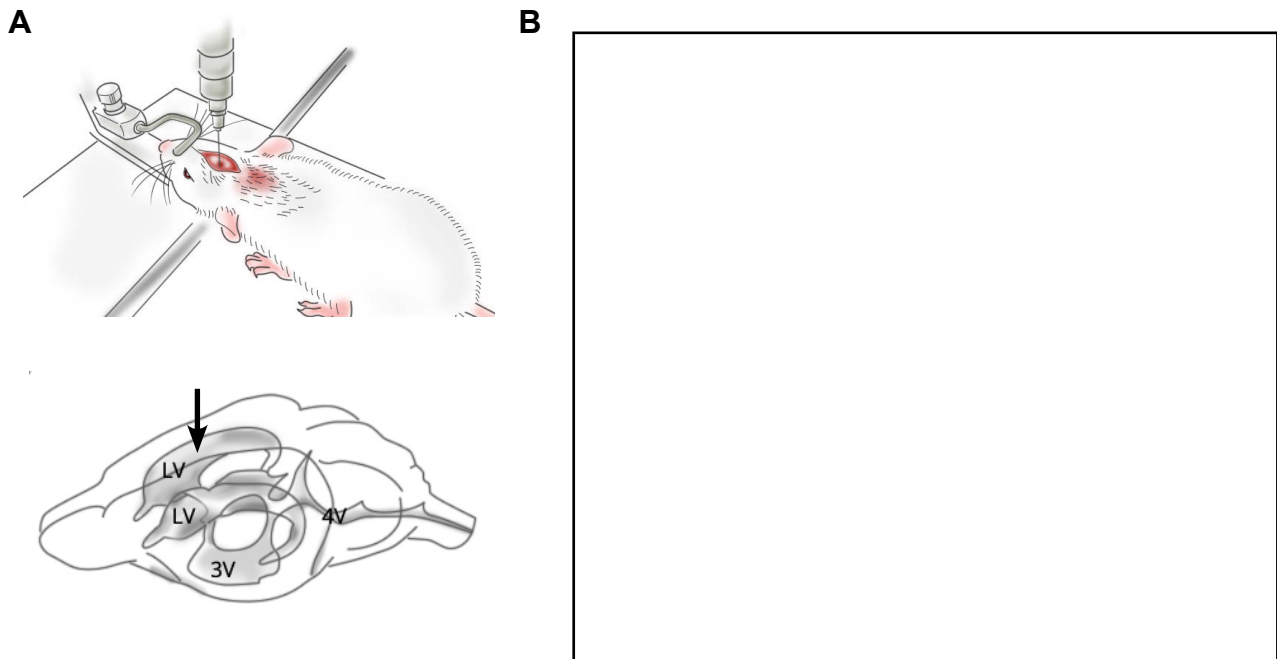


Figure 19 Différences d'incorporation du BrdU à travers l'hypothalamus en fonction de la voie d'administration et de l'exposition au CNTF.

A, L'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) permet d'atteindre le liquide cébrospinal par le ventricule latéral. LV, ventricules latéraux ; 3V, 3ème ventricule ; 4V, 4ème ventricule. **B**, Les résultats de (Kokoeva et al., 2007) montrent la différence de biodisponibilité du BrdU entre une administration périphérique (intrapéritonéale ou i.p.) et une administration i.c.v.. L'effet mitogène du facteur de croissance CNTF (*ciliary neurotrophique factor*) sur la zone ventriculaire et périventriculaire du 3^{ème} ventricule (3V) est également mis en évidence ici, et permet une augmentation significative du nombre de cellules BrdU-positives (cerveaux analysés 7 jours après injection).

l'éminence médiane (Lee et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les tanycytes β_2 sont des progéniteurs neurogéniques de l'éminence médiane.

4.4.2 Tanycytes α

Une autre étude révèle que l'administration i.c.v. de BrdU conduit à une incorporation du BrdU sur *l'ensemble* de la zone ventriculaire du MBH et plus particulièrement au niveau des tanycytes α_2 du noyau arqué. Les auteurs suggèrent que la voie i.c.v. permettrait une meilleure biodisponibilité du BrdU au niveau de l'hypothalamus. L'administration périphérique marquerait uniquement les cellules de l'éminence médiane, en raison d'une perméabilité particulière de la barrière hémato-encéphalique dans cette structure (Figure **19B**) (Kokoeva et al., 2007). Le suivi des tanycytes α_2 avec la lignée *GLAST::CreERT2* permet de montrer que ces cellules sont capables de proliférer et de générer des tanycytes α et β . Plus particulièrement, une sous-population dorsale de tanycytes α_2 exprimant spécifiquement le gène *GFAP* possède une capacité accrue à former des neurosphères *in vitro* en comparaison avec les autres populations de tanycytes. Le suivi de cette population *in vivo* montre qu'elle génère préférentiellement des astrocytes (GFAP+) dans l'ensemble du parenchyme et en moindre proportion des neurones dans les zones périventriculaires du MBH (Robins et al., 2013a). Ces résultats indiquent que les tanycytes α_2 possèdent des caractéristiques de cellules souches.

L'ensemble de ces études montre que – par un processus encore non caractérisé – différentes populations de tanycytes sont capables de générer de nouvelles cellules neuronales et gliales du MBH (Bolborea and Dale, 2013). D'autre part, l'activité proliférative des tanycytes et le nombre de cellules générées dans le parenchyme sont fortement augmentés par l'effet mitogène de nombreux facteurs de croissance au niveau de la zone ventriculaire, tels que FGF, IGF, BDNF, CNTF, etc. (Xu et al., 2005; Pérez-Martín et al., 2010; Haan et al., 2013; Robins et al., 2013a). Ainsi, en plus de constituer une porte de communication entre le système vasculaire, le système ventriculaire et les réseaux neuronaux du MBH, les tanycytes constitueraient une population mixte de cellules souches et de cellules progénitrices.

Similairement aux cellules souches de la SVZ, les tanycytes sont hétérogènes et organisés en différents domaines à travers la zone ventriculaire. Ces différents domaines sont identifiés par l'expression de certains marqueurs (notamment *GFAP*, *Glit-1*, *GLAST*, *Fgf-10*, etc.) (Figure **19**) (Rodríguez et al., 2005; Haan et al., 2013; Robins et al., 2013a). Cette

régionalisation des tanocytes semble déterminer leur capacité à générer préférentiellement d'autres tanocytes, des astrocytes, des oligodendrocytes ou des neurones, ainsi que les zones où s'intègrent leurs dérivés (éminence médiane, noyaux arqués, ventro-médial ou dorso-médial) (Figure 20).

Au regard de ces découvertes, plusieurs questions restent encore en suspens concernant les propriétés des tanocytes.

- Comment se met en place leur régionalisation après la naissance ?
- Quelles sont les différentes fonctions de ces sous-populations de tanocytes ?
- Répondent-elles différemment aux signaux locaux, périphériques et environnementaux (hormones, alimentations, comportements, inflammation, etc.) ?

Enfin, bien que l'observation de cellules exprimant DCX suggère la présence de neuroblastes (Batailler et al., 2014), l'enchaînement précis des étapes cellulaires conduisant un tanocyte à générer un neurone intégré au sein du parenchyme reste à déterminer.

4.4.3 *Autres précurseurs neurogéniques situés dans la zone ventriculaire et le parenchyme*

Plusieurs publications suggèrent que des cellules de la couche épendymaire ou sous-épendymaire de la zone dorsale du 3^{ème} ventricule (zone dépourvue de tanocyte) sont également capables de générer de nouveaux neurones. Certains de ces progéniteurs seraient analogues aux cellules gliales de type B1 de la SVZ (Pérez-Martín et al., 2010; Wang et al., 2012).

D'autre part, la présence de cellules capables d'incorporer le BrdU à distance du mur ventriculaire suggère l'existence de cellules progénitrices établies dans le parenchyme. Une publication récente suggère que les cellules gliales Sox2+ NG2+ constituent un type de cellules souches du parenchyme et une source *complémentaire* de nouveaux neurones et oligodendrocytes chez l'adulte (Robins et al., 2013b). Le potentiel de la glie NG2 à générer de nouveaux neurones, notamment dans le cortex piriforme adulte, a plusieurs fois été suggéré (Guo et al., 2010) et un mécanisme similaire pourrait se produire dans l'hypothalamus (Figure 20).

4.5 **Neurogenèse adulte de l'hypothalamus : implications dans le contrôle du métabolisme**

Les noyaux du MBH sont impliqués dans le contrôle de la *balance énergétique* en agissant sur les sensations d'appétit, la prise de nourriture, la régulation du stockage de graisse et la dépense énergétique. Ce contrôle homéostatique répond à différents signaux

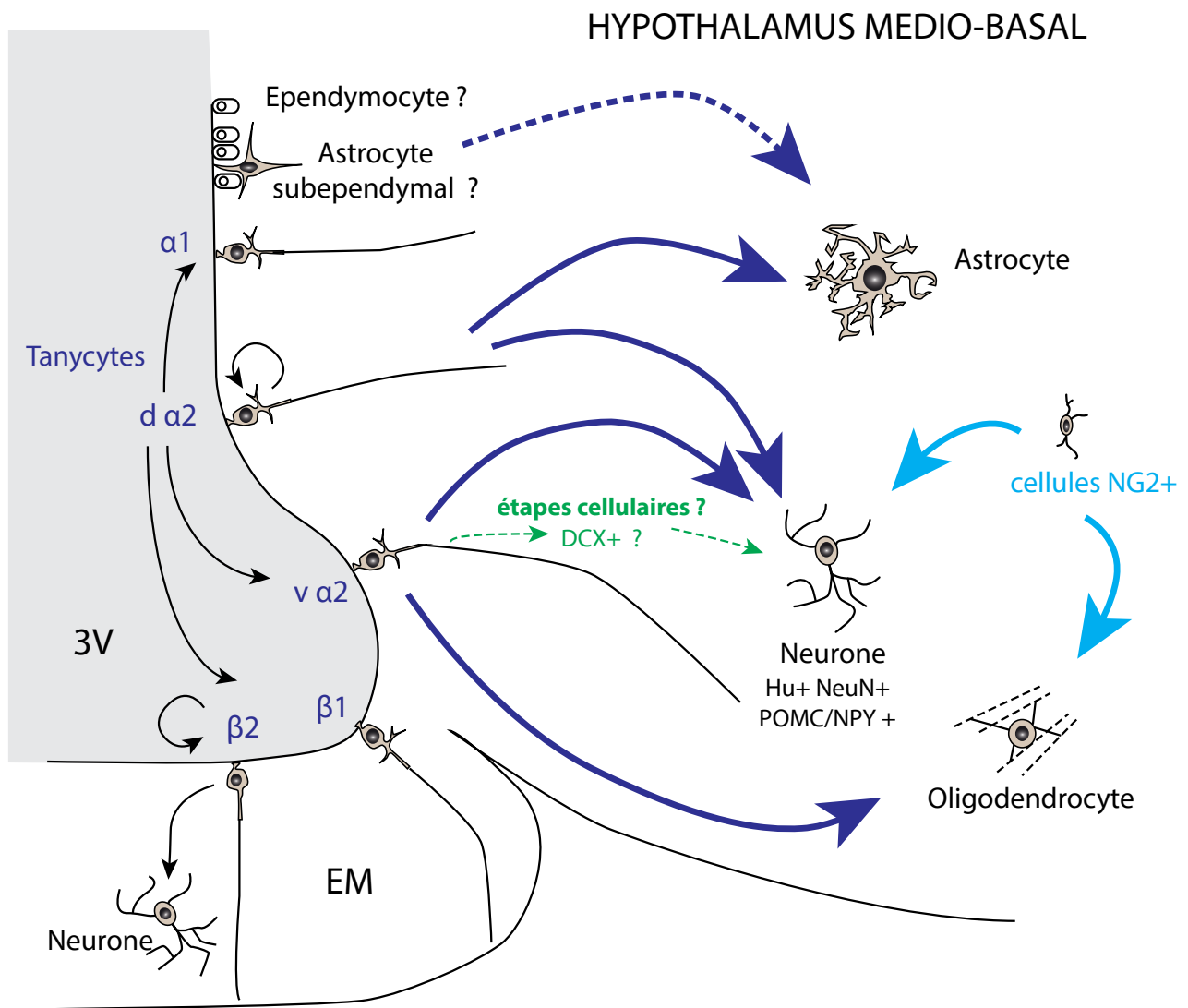


Figure 20 Les tanycytes, progéniteurs neuraux de l'hypothalamus adulte.

Les données obtenues à travers la littérature de ces dix dernières années suggèrent plusieurs sources de neurogenèse au sein de l'hypothalamus médio-basal. D'une part, plusieurs populations de tanycytes sont capables de générer des cellules neuronales chez l'adulte. Les tanycytes alpha-2 dorsaux seraient notamment capables de s'auto-renouveler et de générer des cellules gliales au sein du parenchyme. Les étapes cellulaires de cette neurogenèse adulte ne sont pas encore identifiées (en vert) mais impliqueraient des cellules exprimant DCX. D'autre part, certaines publications suggèrent la présence de cellules épendymales ou d'astrocytes neurogéniques dans la partie dorsale du mur. Enfin, une dernière publication montre que les cellules NG2-positives sont capables de se différencier en neurones et suggèrent que ces cellules constitueraient une source parenchymale complémentaire mais prépondérante de neurogenèse et de gliogenèse (en bleu clair). EM, éminence médiane ; 3V, 3^{ème} ventricule.

systémiques (p. ex. glucose, acides gras, acides aminés, etc.), dont un certain nombre d'hormones (p. ex. leptine, ghréline, insuline, etc.). Deux populations de neurones du noyau arqué aux fonctions antagonistes sont au centre de ce contrôle :

- les neurones *anorexigènes* qui produisent de la pro-opiomélanocortine (POMC) et favorisent la perte de poids
- et les neurones *orexigènes*, caractérisés par la production de NPY (*Neuropeptide Y*) et d'AgRP (*Agouti-related peptide*), qui favorisent le gain de poids.

L'obésité et les désordres métaboliques seraient en partie dus à une *inflammation* de cette partie de l'hypothalamus et à une modification subséquente de ces circuits neuronaux (notamment par apoptose sélective de certaines populations) menant à une dérégulation pathologique permanente du contrôle de la balance énergétique (Tang et al., 2015). Trois études récentes, présentées ci dessous, mettent en évidence l'interdépendance entre ce rôle homéostatique du MBH et la neurogenèse adulte.

4.5.1 La neurogenèse adulte permet de modifier les circuits neuronaux de la balance énergétique, en conditions physiologique et pathologique

Le traitement au CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*) chez les individus obèses induit une perte de poids à long terme, qui perdure après l'arrêt du traitement au CNTF. Chez la souris, ce facteur de croissance est capable de stimuler la neurogenèse adulte au niveau du MBH (Kokoeva, 2005). Certains des nouveaux neurones produits expriment les marqueurs POMC ou NPY et sont activables par une co-injection de l'hormone leptine, deux caractéristiques qui suggèrent leur intégration fonctionnelle dans les circuits neuronaux régissant la balance énergétique. La suppression de la neurogenèse – par injection du bloqueur mitotique Ara-C – entraîne une suppression de l'effet à long terme du CNTF sur le poids. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'effet à long terme du CNTF passe par une augmentation de la neurogenèse adulte et l'intégration de nouveaux neurones dans le circuit contrôlant la balance énergétique. Ainsi, malgré leurs faibles taux de production au niveau du MBH, les nouveaux neurones sont susceptibles d'avoir un impact significatif sur les fonctions de l'hypothalamus (Kokoeva, 2005).

4.5.2 La neurogenèse adulte permet une régénération de populations neuronales soumises à une dégénérescence induite

L'ablation rapide et spécifique des neurones orexigènes (NPY+ AgRP+) provoque une sévère anorexie et une perte de poids. Étonnamment, une dégénération progressive de ces mêmes neurones n'a pas d'effet sur l'alimentation ou le poids. Par contre, si la neurogenèse

adulte est bloquée, cette même neurodégénération progressive conduit alors à un phénotype anorexique. Les nouveaux neurones orexigènes produits par la neurogenèse adulte sont donc suffisants pour compenser les effets de cette neurodégénération progressive (Pierce and Xu, 2010).

4.5.3 L'altération de la neurogenèse adulte est impliquée dans l'étiopathogénie des désordres alimentaires et du vieillissement.

Lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisses (*high fat diet*), le nombre et la prolifération des cellules souches Sox2⁺ de l'hypothalamus sont diminués. La survie et la différenciation des cellules nouvellement générées en neurones, oligodendrocytes et astrocytes sont également affectées (Li et al., 2012). Cet effet serait lié à une augmentation de la sécrétion d'interleukine par les microglies (TNF α et IL-1 β) et donc à l'apparition d'un état inflammatoire. Celui-ci conduirait à une activation de voies pro-apoptotiques au niveau des cellules souches (notamment la voie IKK β /NF- κ β), ainsi qu'à une inhibition de la différenciation neuronale (par activation de la voie Notch). De plus, une activation permanente de la voie IKK β /NF- κ β dans des cellules souches Sox2⁺ est suffisante pour provoquer une obésité et des symptômes diabétiques chez des souris nourries normalement (Li et al., 2012). Ce lien entre alimentation, inflammation et activité/maintien des cellules souches adultes du MBH est intéressant. Il a été montré récemment qu'un mécanisme similaire de micro-inflammation de l'hypothalamus (impliquant également la voie IKK β /NF- κ β) est responsable du vieillissement systémique du corps avec le temps (responsable en particulier d'une réduction des capacités physiques et cognitives). Ce vieillissement entraîne notamment une diminution de la neurogenèse au niveau de l'hippocampe, de la SVZ et de l'hypothalamus (Zhang et al., 2013). Ce mécanisme pourrait-il expliquer le lien toujours présumé entre qualité de l'alimentation et espérance de vie (Tang et al., 2015) ?

Les études résumées dans ces trois derniers paragraphes montrent une implication de la neurogenèse adulte du MBH dans le contrôle par l'hypothalamus de l'homéostasie énergétique. Cette régulation croisée entre l'activité neuronale, la neurogenèse, l'alimentation et la prise de poids semble être dynamique et dépendre de la zone étudiée, du paradigme expérimental utilisé ou encore du sexe de l'animal (Kokoeva, 2005; Lee et al., 2012; Severi et al., 2013; Lee et al., 2014). Ces résultats permettent de supposer que le contrôle de la balance énergétique par le MBH contient une composante à court terme, passant par l'activité neuronale, et une composante à long terme, passant par l'activité proliférative des cellules

souches et la production de nouveaux neurones fonctionnels. En cas de dérèglement pathologique de la balance énergétique, une inflammation locale du MBH pourrait provoquer un épuisement de la niche de cellule souche (notamment par apoptose) et renforcer à long terme le dérèglement de la balance énergétique (Tang et al., 2015). L'influence des cellules souches adultes pourrait également reposer sur la génération de cellules gliales. Comme mentionné précédemment, les tanycytes α génèrent des astrocytes, notamment après une activation par le FGF (Robins et al., 2013a). Or il a été montré récemment que les astrocytes participent activement à la fonction du MBH et sont par exemple impliqués dans la signalisation impliquant l'hormone leptine (Kim et al., 2014). Comprendre comment la niche du MBH génère des cellules neuronales et gliales pourrait permettre d'améliorer le traitement de l'obésité et des désordres alimentaires (comme l'anorexie).

Les neurones liés au contrôle de l'alimentation (PomC+ ou NPY+) ne représentent qu'une très faible proportion des neurones générés au niveau de l'hypothalamus adulte ; ce qui suggère que la neurogenèse pourrait également participer aux autres fonctions autonomes de l'hypothalamus : interaction sociale, sexualité, maternité, rythmes circadiens, etc.

La présence de cellules souches au sein de l'hypothalamus a été montrée chez le poisson-zèbre, les rongeurs, et le mouton (Migaud et al., 2010; Wang et al., 2012; Mohr and Sisk, 2013). Cependant, avant d'exclure définitivement le menu *Maxi Best Of* de son alimentation pour ménager sa neurogenèse adulte, se pose la question : cette niche est-elle présente et fonctionnelle chez l'Homme ?

5 Implication des cellules des capsules frontières dans le développement du système nerveux périphérique (et de mon projet de thèse)

Le système nerveux périphérique (SNP) est originaire de la crête neurale. Durant la neurulation, la crête neurale est spécifiée à la bordure entre l'ectoderme et le neuroectoderme et occupe la partie dorsale du tube neurale lorsque celui-ci se referme (Figure 4A). Les cellules de la crête neurale vont alors subir une transition épithélio-mésenchymateuse (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). Elles délaminent du tube et migrent, souvent sur de longues distances, puis se différencient en une variété de types cellulaires, incluant les mélanocytes de la peau, les neurones et cellules gliales du SNP, ainsi que les tissus osseux et cartilagineux de la tête. Au niveau du tronc, la migration des cellules de la crête neurale se décompose en trois flux distincts :

- un flux ventral et profond entre les somites et le tube neural qui va générer les neurones du SNP autonome,
- un flux ventro-latéral passant par la moitié antérieure des somites qui donnera naissance aux neurones sensoriels et cellules de Schwann,
- un flux dorso-latéral qui va donner naissance aux mélanocytes

La crête neurale donne enfin naissance à une population cellulaire transitoire appelée **cellules des capsules frontières** (CF). Ces cellules sont localisées aux niveaux des points d'entrée et de sortie des nerfs périphériques et crâniens, à l'interface entre le SNC et le SNP (Figure 21A). Le facteur de transcription *Krox20* fut le premier marqueur des cellules CF. Son expression au niveau des CF est détectable dès E10,5 chez la souris (Figure 21B). Grâce à ce marqueur – et aux nombreux outils génétiques développés autour – le laboratoire de Patrick Charnay a découvert plusieurs fonctions des cellules CF durant le développement du SNP. Tout d'abord, elles sont nécessaires au confinement des corps cellulaires des motoneurones dans la moelle épinière (Figure 21C) : leur élimination chez la souris conduit en effet à la translocation des corps cellulaires des motoneurones vers la périphérie (Vermeren et al., 2003). D'autre part, le suivi des cellules CF et de leurs dérivés *in vivo*, au moyen de la lignée *Krox20^{Cre}*, a permis de montrer qu'elles migrent le long des racines des nerfs et dans les DRG. Les CF donnent alors naissance à la quasi-totalité des cellules de Schwann des racines des nerfs et à une partie des neurones sensoriels et des cellules satellites du DRG (Figure 21D) (Maro et al., 2004).

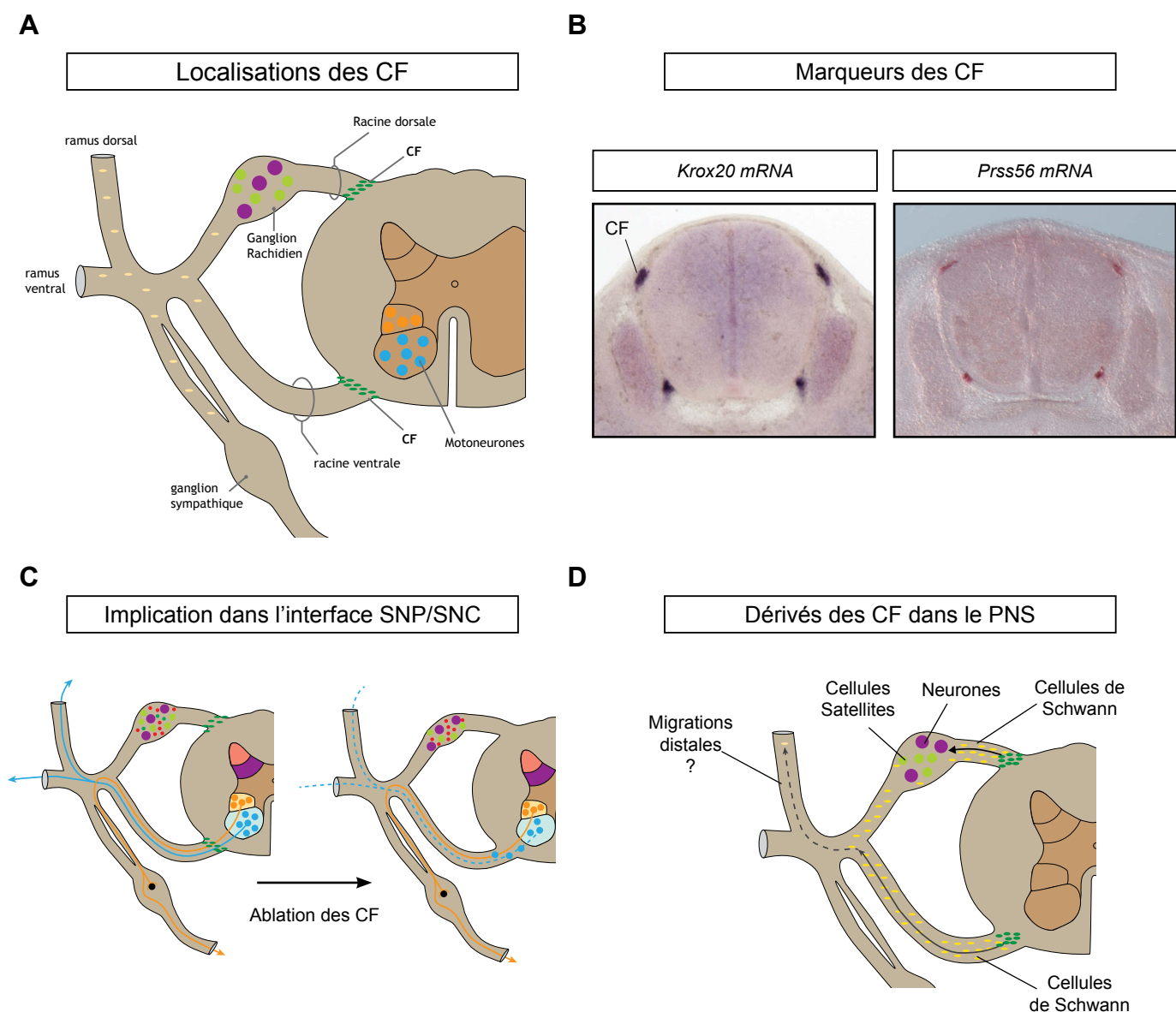


Figure 21 Caractéristiques des cellules des capsules frontières (CF).

A, Les cellules des CF (en vert) sont transitoirement localisées aux points d'entrée des axones sensoriels au niveau de la racine dorsale et aux points de sortie des axones moteurs au niveau de la racine ventrale du tube neural embryonnaire. **B**, Les résultats obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes transverses d'embryon à E12.5 montre que les cellules des CF expriment spécifiquement les gènes *Krox20* (aussi connu sous le nom d'*Egr2*) et *Prss56* (ou *L20*). **C**, L'élimination des cellules des CF conduit au déplacement d'une partie des corps cellulaires des motoneurones vers la périphérie. Les cellules des CF jouent donc un rôle dans le confinement des corps cellulaires des motoneurones à l'interface entre le SNC et le SNP. **D**, Les cellules des CF constitue une source de cellules gliales et neuronales des racines ventrales et dorsales et des ganglions rachidiens. Certaines de ces cellules seraient susceptibles de migrer vers des structures plus périphériques, cependant, en 2010, le devenir de ces cellules était encore inconnu...

Indépendamment des cellules CF, le gène *Krox20* devient exprimé par les cellules de Schwann à partir de E15,5 chez la souris, ce qui nous empêche de l'utiliser pour suivre les dérivés des cellules CF au delà de cette période (Topilko et al., 1994). Pour contourner cette limite, le laboratoire a identifié plusieurs nouveaux marqueurs de ces cellules, dont le gène *Prss56* (précédemment appelé *L20*) (Figure **21B**) (Coulpier et al., 2009). Dans le SNP, son expression est restreinte aux CF et absente des cellules de Schwann ce qui en fait un candidat idéal pour le suivi des dérivées des CF chez l'adulte. Le laboratoire a récemment généré une lignée murine portant insertion de Cre recombinase au locus de *Prss56* (*Prss56^{Cre}*). L'utilisation de cette lignée en combinaison avec des lignées rapportrices (inductibles par la Cre) a permis de révéler qu'une partie des dérivées des CF migrent le long des nerfs jusqu'à la peau et donnent naissance à des cellules de Schwann au niveau des terminaisons nerveuses et à des cellules souches au potentiel neurogénique. Cette étude, dont le manuscrit est en révision et à laquelle j'ai initialement contribué, est présentée en annexe : (Gresset et al., en révision).

Durant cette étude, j'ai découvert que *Prss56* était également exprimé indépendamment des cellules CF dans d'autres structures embryonnaires : oreille interne, bulbe olfactif, bourgeon caudal, cerveau, etc. En analysant le devenir de ces cellules chez l'adulte, j'ai été surpris de constater la présence de cellules potentiellement souches tracées dans le cerveau au niveau des trois niches neurogéniques : la SVZ du mur latéral, le GD de l'hippocampe et l'hypothalamus. Je me suis donc attelé au cours de ma thèse à l'étude de la neurogenèse adulte au moyen de l'outil *Prss56^{Cre}*. La partie suivante de ce manuscrit présente les résultats de ces observations, principalement à travers le manuscrit (Jourdon et al.) qui, à l'instant où vous lirez ces lignes, sera je l'espère soumis à un journal scientifique pour publication (voire accepté si vous avez noté de la poussière sur la page de couverture en ouvrant cette thèse...).

RESULTATS

Présentation

L'absence de marqueur spécifique des cellules souches neurales adultes complique l'étude de la neurogenèse adulte et ralentit le rythme des découvertes dans ce domaine. L'étude présentée dans cette partie révèle que le gène *Prss56* est exprimé dans des populations très restreintes de cellules souches neurales. La lignée *Prss56^{Cre}*, qui permet de suivre le devenir des cellules exprimant ce gène, pourrait constituer un outil stratégique dans l'étude du développement, du fonctionnement et de l'hétérogénéité des niches neurogéniques du système nerveux murin.

D'une part, la lignée *Prss56^{Cre}* permet de suivre le devenir d'une sous-population de glies radiaires du pallium embryonnaire et leur transformation progressive en cellules souches neurales adultes du GD. D'autre part, au niveau du mur latéral, le gène *Prss56* n'est exprimé qu'après la naissance dans une sous-population de cellules souches de type B1 situées principalement dans partie ventrale de la SVZ. Le traçage de ces cellules régionalisées confirme qu'elles génèrent *préférentiellement* deux sous-types d'interneurones du BO. Enfin, nous montrons qu'une sous-population de tanocytes alpha-2 du 3^{ème} ventricule exprime le gène après la naissance. Le suivi de cette population met en évidence un nouveau type cellulaire potentiellement impliqué dans la neurogenèse postnatale de l'hypothalamus.

A ces résultats, je me permets d'ajouter quelques curieuses données préliminaires, qui suggèrent que certains neurones générés par la SVZ adulte s'intégreraient localement dans la SVZ, la RMS et le striatum.

L'article suivant est écrit en anglais et présenté sous la forme d'un manuscrit en prépublication. Les cinq figures principales sont présentées avec le texte et les figures supplémentaires sont disposées à la fin. Les données additionnelles, qui ne seront pas publiées dans cet article, sont présentées à la suite, sous la forme d'un court paragraphe de résultats accompagné de deux figures.

- PARTIE 1 -

***Prss56*, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain**

**Alexandre Jourdon^{1,2}, Aurélie Gresset¹, Nathalie Spassky¹, Patrick Charnay¹,
Piotr Topilko¹ and Renata Santos¹**

¹ Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), and Inserm U1024, and CNRS UMR 8197, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; ² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris06, IFD, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05

Correspondence should be addressed to: Patrick Charnay, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; charnay@biologie.ens.fr

Abbreviated title: *Prss56* as a marker of adult neurogenesis

Keywords: adult neurogenesis, neural stem cell, subventricular zone, olfactory bulb, dentate gyrus, hypothalamus, tanycyte

ABSTRACT

Adult neurogenesis in the mammalian brain is restricted to specific regions, such as the dentate gyrus (DG) in the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) in the walls of the lateral ventricles. Here, we used a mouse line carrying a knock-in of the Cre recombinase in the *Prss56* gene, in combination with two Cre inducible fluorescent reporters (*Rosa26^{mT/mG}* and *Rosa26^{tdTom}*), to perform genetic tracing of *Prss56*-expressing cells in the adult brain. We found labeled cells in three neurogenic niches: the DG, the SVZ and the hypothalamus ventricular zone (HVZ). In the prospective DG, *Prss56* is expressed during embryogenesis in a subpopulation of radial glia. The pattern of migration and differentiation of traced cells during development recapitulates the successive steps of DG neurogenesis, including the formation of a subpopulation of adult neural stem cells (NSC). In the SVZ, *Prss56* is expressed postnatally in a subpopulation of adult NSC mainly localized in the medial-ventral region of the lateral wall. This subpopulation preferentially gives rise to deep granule and Calbindin-positive periglomerular interneurons in the olfactory bulb. Finally, *Prss56* is also expressed in a subpopulation of α 2-tanycytes, which are potential adult NSC of the HVZ. Our observations suggest that some traced α 2-tanycytes translocate their soma into the parenchyma and may give rise to a novel cell type in this territory. Altogether, this study establishes the *Prss56^{Cre}* line as an efficient and promising new tool to study various aspects of adult neurogenesis in the mouse.

INTRODUCTION

Neurogenesis persists throughout life in mammals in two major neurogenic niches: the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) in the hippocampus, and the subventricular zone (SVZ) in the walls of the lateral ventricles (Altman and Das, 1965a; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). More recently, adult neurogenesis was also observed in other regions of the brain, such as the hypothalamus in rodents (Kokoeva et al., 2005; Pierce and Xu, 2010; Robins et al., 2013) and the striatum in humans (Ernst et al., 2014).

The general organizations of adult SGZ and SVZ germinal niches are similar (reviewed in (Ihrle and Álvarez-Buylla, 2011; Ming and Song, 2011; Gage and Temple, 2013)). A population of cells with astroglial properties behaves as neural stem cells (NSC), generating intermediate progenitors (also named transient amplifying progenitors) by asymmetric division. These progenitors divide and give rise to neuroblasts that continue to proliferate, migrate and differentiate into neurons. In the DG, the neuroblasts migrate into the granular layer and mature into excitatory granule neurons. In the SVZ, the neuroblasts migrate over long distances along the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb (OB). In the OB, they differentiate into two major types of interneurons, periglomerular cells (PGC) in the glomerular layer, and granule cells (GC) in the granule cell layer. Adult born neurons integrate into pre-existing circuits of the DG and OB, but exhibit electrophysiological properties different from those of their embryonic counterparts until they have reached complete maturation (Esposito, 2005; Ge et al., 2007; Marín-Burgin et al., 2012; Deshpande et al., 2013). Although only a small subpopulation of neurons are generated postnatally, their enhanced synaptic plasticity confers the adult circuitry the ability to evolve in response to experience, without affecting its general stability (Ge et al., 2007; Lepousez et al., 2014). Adult neurogenesis in these niches is therefore essential for some forms of learning, memory and mood regulation (Zhao et al., 2008).

As indicated above, several studies have also reported the existence of neural stem/progenitor cells and neurogenesis in the adult hypothalamus (Pencea et al., 2001; Markakis, 2004; Kokoeva et al., 2005; Xu et al., 2005; Pierce and Xu, 2010; Robins et al., 2013). Since the hypothalamus is a master regulator of the neuroendocrine function, this finding suggests that the integration of newborn neurons may affect the control of basic physiological functions, such as feeding. Indeed, blocking adult neurogenesis in the medial-basal hypothalamus results in altered weight and metabolic activity in adult mice (Lee et al.,

2012). In this part of the hypothalamus, the third ventricle is lined dorsally by ciliated ependymal cells and ventrally by non-ciliated radial glial-like cells, termed tanycytes. The tanycytes constitute a heterogeneous population divided in four subtypes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ and $\beta 2$) depending on the dorsal-ventral position of the cell bodies, projection of the basal processes and expression of specific markers (Rodríguez et al., 2005; Haan et al., 2013; Robins et al., 2013). Recent studies, based on fate mapping and functional characterization, revealed that populations of $\alpha 2$ and $\beta 2$ tanycytes self-renew and generate glial and neuronal derivatives (Lee et al., 2012; Haan et al., 2013; Robins et al., 2013). However the cellular pathways involved in this process are still unknown.

Rapid progress in the understanding of the adult NSC properties and functions was made possible by the development of new tools, such as proliferation markers, viral vectors and conditional mutant mice (Gage and Temple, 2013). However, additional specific markers are still needed to address many issues, old and recent, concerning adult neurogenesis. The *Prss56* gene (previously named *L20*) encodes a secreted trypsin-like serine protease involved in eye development in mice and humans, although its precise function has not been elucidated so far (Gal et al., 2011; Nair et al., 2011). We have shown that *Prss56* is also expressed in neural crest-derived boundary cap cells during mouse embryonic development (Coulpier et al., 2009). To further study the function of this gene and investigate the fate of *Prss56*-expressing cells, we have generated a knock-in allele, *Prss56^{Cre}*, carrying the Cre recombinase in the locus (Gresset et al., manuscript submitted for publication). Combination of this allele with Cre-activable reporter constructs allowed tracing of *Prss56*-expressing cells and their derivatives. Unexpectedly, in the postnatal brain, traced cells were found specifically in several neurogenic niches, including the SGZ, the SVZ and the lateral wall of the hypothalamus. In the developing DG, we observed that *Prss56* is expressed in a subpopulation of radial glia from embryonic day (E) 13.5 in the dentate ventricular zone (dVZ). The pattern of migration and differentiation of their derivatives faithfully recapitulates the successive steps of morphogenesis and neurogenesis of the DG, indicating that these cells participate to its formation. In the SVZ, *Prss56* is expressed postnatally in a ventral subpopulation of NSC and the *Prss56^{Cre}* allele allows tracing of their derivatives through the RMS to the OB, where they differentiate preferentially into deep GCs and Calbindin-positive PGCs. Finally, in the hypothalamus, *Prss56* is expressed in $\alpha 2$ type tanycytes that proliferate, translocate their soma into the parenchyma and can generate neurons or glia in the arcuate and dorsal-medial nuclei in the adult. The newly generated *Prss56^{Cre}* mouse line therefore appears

as a powerful genetic tool to further study the development, the organization and the functions of postnatal neurogenic niches.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The *Prss56*^{Cre} mouse line was generated by insertion of the Cre recombinase coding sequence immediately after the ATG start codon of the *Prss56* gene (Gresset et al., manuscript submitted for publication). Genotyping was performed by PCR using DNA extracted from the tail and the following primers: 5'-CAGGTGAGGTGCGGACCATT-3', 5'-ACGGAAATCCATCGCTCGACCAGTT-3' and 5'-AAACCACTGCCCACCGACAT-3'. The *Prss56*^{Cre/Cre} homozygous animals are viable and fertile. The other mouse lines, as well as their genotyping, were described previously: *hGFAP:GFP* (Nolte et al., 2001), *Rosa26*^{mT/mG} (Muzumdar et al., 2007) and *Rosa26*^{tdTom} (Madisen et al., 2010). All lines were maintained in a mixed *C57BL/6/DBA/2* background. Brains were extracted after transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde, then post-fixed in the same solution overnight at 4°C and cut with a vibratome. When required, vibratome sections were kept in storage buffer (30% glycerol, 30% ethylene glycol in sodium phosphate buffer) at -20°C until further processing. Lateral wall whole-mounts were prepared as described and fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 3 h (Mirzadeh et al., 2010). Mice housing and breeding, euthanasia and experimental procedures were performed in accordance with the Council of European Union directive of September 22, 2010 (2010/63/UE) and approved by the French Ethical Committee (Project n° B750520).

Immunohistochemistry and imaging

Vibratome sections (50-150 µm) and whole-mounts were blocked for 1 h at room temperature with 10% fetal bovine serum, 0.3% Triton X-100 in phosphate buffered saline solution (PBS). Primary antibodies were incubated in the same solution overnight at 4°C and secondary antibodies were incubated for 3 h at room temperature in 1% fetal bovine serum, 0.3% Triton X-100 in PBS solution. Sections were counterstained with Hoechst 33342 (Sigma) for nuclei detection. The following primary antibodies were used: mouse anti-APC (1/500, Abcam); rat anti-BrdU (1/100, AbCys); rabbit anti-BLBP (1/200, Millipore); mouse anti-Calbindin (1/500, Swant); goat anti-Calretinin (1/500, Swant); mouse anti-β-catenin (1/200, BD Transduction); goat anti-DCX (1/300, Santa Cruz); rabbit anti-dsRed (1/400, Clontech); mouse anti-GFAP (1/100, Millipore); rabbit anti-GFAP (1/300, Dako); rabbit anti-GFP (1/500, Invitrogen); rat

anti-GFP (1/500, Nacalai Tesque); mouse anti-Nestin (1/100, Millipore); mouse anti-NeuN (1/800, Millipore); goat anti-NeuroD (1/400, Santa Cruz Biotechnology); goat anti-Prox1 (1/400, R&D Systems); mouse anti-S100 (1/500, Sigma); goat anti-Sox2 (1/200, Santa Cruz Biotechnology); goat anti-Sox10 (1/100, Santa Cruz Biotechnology); mouse anti-TH (1/1000, Millipore); mouse anti- β III-tubulin (1/600, Millipore); mouse anti- γ -tubulin (1/500, Sigma); chicken anti-vimentin (1/100, Millipore). Secondary antibodies labeled with Cy3, Cy5, Alexa488, Alexa597 and Alexa647 were from Jackson Immuno Research and Molecular Probes. Sections were mounted in Fluoromont (SouthernBiotech). Images were acquired on Leica confocal microscopes SP5 and SP8. Image processing and analysis were performed using ImageJ and Adobe Photoshop softwares. Cell counting data in the SVZ, RMS, OB and DG regions involved the analysis of at least three different confocal stacks per region and per animals. Co-localization with different markers was confirmed by the analysis of single optical slices.

***In situ* hybridization and BrdU labeling**

mRNA *in situ* hybridization was performed on brain vibratome sections (150 μ m) from wild type and *Prss56*^{Cre/Cre} animals using digoxigenin-labeled RNA probes synthesized by PCR as described previously (Coulpier et al., 2009). For BrdU labeling, 3 month-old mice received daily intraperitoneal injections (IP) of 5-bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma) in saline solution at 50 mg/kg/day for 7 days. The chase periods were either 5 or 12 weeks after the last injection and 3 to 4 animals were analyzed per group. For BrdU immunodetection, sections were pre-treated with HCl 2N at 37°C for 30 min before primary antibody labeling. FGF and BrdU infusions were performed as described (Robins et al., 2013). In brief, 3 month-old mice were implanted with a steel guide cannula to reach the right lateral ventricle using the following stereotaxic coordinates: Bregma, AP: -0.5 mm; L: +1.2 mm; DV: -2.5 mm. Osmotic pumps (Alzet) were installed and filled with artificial cerebrospinal fluid containing 1 mg/mL mouse serum Albumin (Sigma), 1 mg/mL BrdU and 60 μ g/mL bFGF (Sigma). The solution was released for 7 days in the lateral ventricle. Mice were sacrificed 6 weeks after the beginning of the infusion.

RESULTS

Fate mapping of *Prss56*-expressing cells in the neurogenic niches of the adult brain

To identify *Prss56*-expressing cells and their progeny in the adult brain, we first introduced the knock-in *Prss56*^{Cre} allele (Gresset et al., manuscript submitted for publication; Fig. 1a) into the *Rosa26*^{mT/mG} reporter line, in which Cre recombination leads to permanent expression of the membrane-targeted enhanced green fluorescent protein (Madisen et al., 2010) (Muzumdar et al., 2007). Analysis of parasagittal sections through *Prss56*^{Cre/+}*Rosa26*^{mT/mG} adult brain revealed the presence of GFP-positive cells in two neurogenic niches, the DG and the SVZ, as well as in the RMS and the OB (Fig. 1b). We therefore investigated whether these traced cells participate in adult neurogenesis.

In the DG, we observed different types of labeled cells, including neurons, NSCs and astrocytes (Fig. 1c; Supplemental Fig. 1a). Most GFP-positive cells show low levels of fluorescence and correspond to granule neurons, with their cell bodies in the granular layer, dendrites in the molecular layer and a single axon extending to CA3 through the hilus (Fig. 1c; Supplemental Fig. 1a, b'). More highly fluorescent cells, showing a radial morphology, a cell body located in the SGZ, a radial process extending through the granular layer and a dense arborization in the molecular layer, express glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Nestin, two markers of NSCs (Fig. 1d, e; Supplemental Fig. 1b, b'). These cells are likely to correspond to the so-called type I NSCs of the DG (Kempermann et al., 2004). Another population of highly fluorescent cells, observed in the molecular layer and hilus, show morphologies consistent with an astrocytic identity (Fig. 1c; Supplemental Fig. 1a).

Tracing of transient amplifying progenitors and neuroblasts was difficult to establish because of the membrane localization of the GFP reporter. To circumvent this difficulty, we used another reporter, *Rosa26*^{tdTom}, for which Cre-mediated recombination results in the expression of cytoplasmic tandem dimer tomato (tdTom, Fig. 1a; Supplemental Fig. 1c; (Madisen et al., 2010)). Using this reporter, together with a *hGfap::GFP* allele (Beckervordersandforth et al., 2010), we first confirmed that some of the *Prss56*-traced cells simultaneously express GFAP and Nestin (Supplemental Fig. 1d, d'), establishing that they are type I NSCs. These cells express low levels of the tdTom reporter (Supplemental Fig. 1d). In addition, co-labeling for the T-box brain protein 2 (Tbr2) and doublecortin (DCX) markers indicated that transient amplifying progenitors (Tbr2-positive) and neuroblasts (DCX-positive) were among the traced cells (Fig. 1f). To confirm that traced NSCs in the SGZ

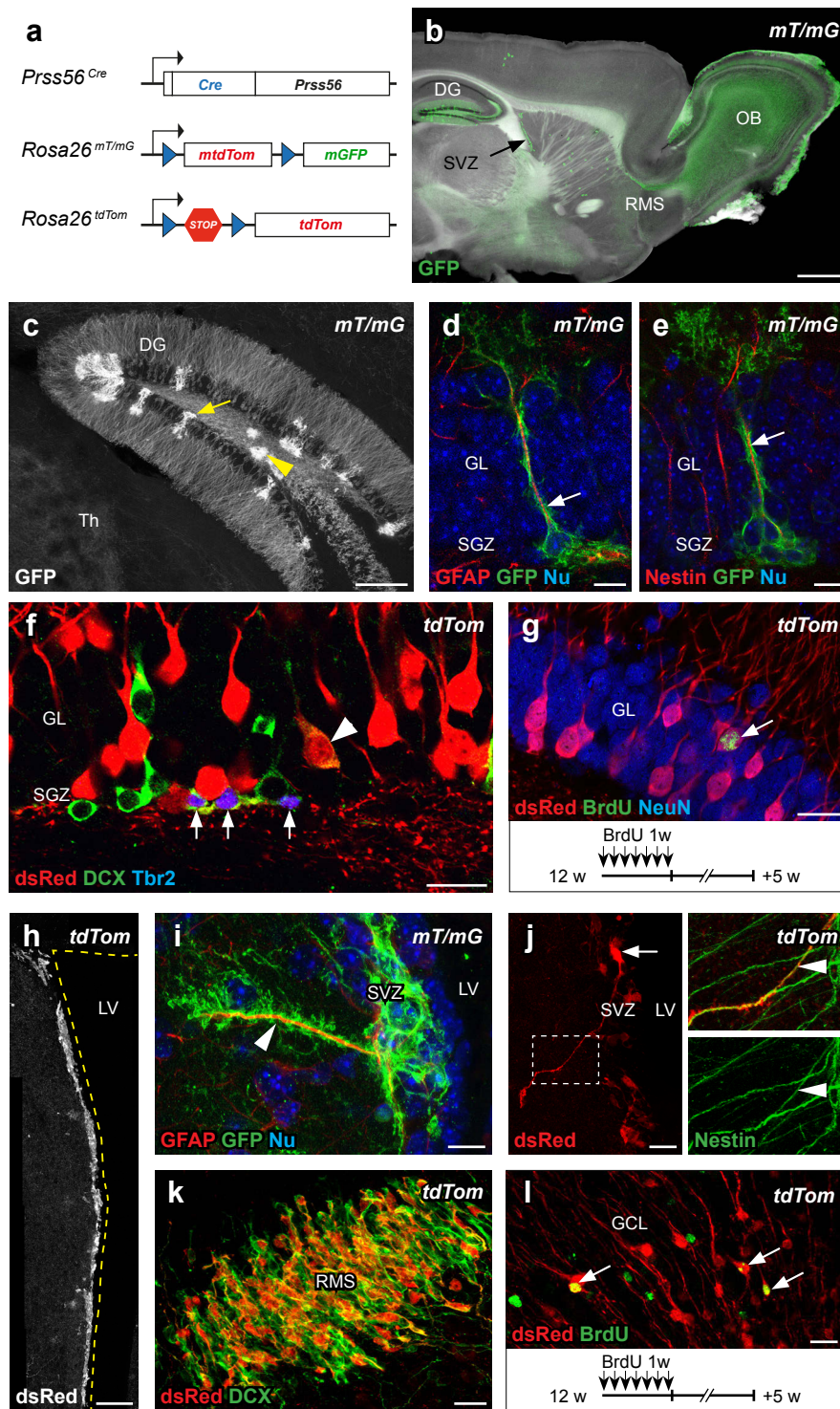


Figure 1. Tracing of *Prss56*-expressing cell derivatives in the adult brain. **a** Schematic representation of the *Prss56*^{Cre}, *Rosa26*^{mT/mG} and *Rosa26*^{tdTom} alleles. **b** Parasagittal section through an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mT/mG/+} brain, revealing labeled (green) cells in the DG, SVZ, RMS and OB. Also note the presence of labeled olfactory ensheathing cells at the periphery of the bulb. **c** Coronal section through an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mT/mG/+} DG, showing the presence of labeled type I NSCs (arrow), astrocytes (arrowhead) and granule neurons (mostly identifiable by their axons and dendrites). **d, e** Optical slices of confocal z-stacks showing that labeled (green) type I NSCs express GFAP (**d**, arrow) and Nestin (**e**, arrow). **f** Optical slice through an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} SGZ, showing traced (red) transient amplifying progenitor cells that are DCX- and Tbr2-positive (arrows) and a traced DCX-positive neuroblast (arrowhead). **g** Optical slice through a *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} SGZ, showing a traced (red) NeuN-positive granule neuron that incorporated BrdU during adulthood (arrow). The BrdU injection protocol is schematized below. **h** Coronal confocal image from a *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain showing traced cells localized in the SVZ (the limit of the lateral ventricle is indicated by the dotted line). **i, j** Confocal image of labeled (green in **i**) and red in **j**) B1 cells in the SVZ showing the cell body close to the ependymal layer (arrow in **j**) and the long extension into the striatum (arrowheads). These cells express GFAP (**i**, arrowhead) and Nestin (**j**, arrowhead). Note the absence of GFP in ependymal cells in **i**. **k** Confocal stack of the RMS, showing traced (red) DCX-positive neuroblasts. **l** Coronal confocal image of the

OB, showing traced (red) neurons that have incorporated BrdU during adulthood. The BrdU injection protocol is schematized below. DG, dentate gyrus; GCL, granular cell layer of the OB; GL, granular layer of the DG; LV, lateral ventricle; OB, olfactory bulb; RMS, rostral migratory stream; SGZ, subgranular zone; SVZ, subventricular zone; Th, thalamus. Scale bar 1 mm (**b**), 200 μm (**c**), 100 μm (**h**), 20 μm (**f, g, j-l**) and 10 μm (**d, e, i**).

proliferate and give rise to new neurons in the adult brain, we performed BrdU labeling in 3 month-old mice. Five weeks later, traced, BrdU-labeled neurons were identified in the DG, indicating that they were generated during adulthood (Fig. 1g). Altogether, our analysis indicates that our tracing system labels all the steps of the neurogenic and gliogenic pathway in the DG: adult NCSs, transient amplifying progenitors, neuroblasts, neurons and astrocytes. Nevertheless, in the dorsal DG, *Prss56^{Cre}*-traced neurogenesis represents only a minor part of the neurogenic activity (11.3 ± 6.6 % of the BrdU-positive cells were traced in the granular layer, n=3).

Tracing of the progeny of *Prss56*-expressing cells in the adult brain also labeled the SVZ-RMS-OB neurogenic pathway (Fig. 1b, h-k; Supplemental Fig. 1e). In the SVZ, we observed labeled cells with astrocytic features and expressing both GFAP and Nestin (Fig. 1i, j; Supplemental Fig. 1e, e'). Their cell body lies close to the ependymal cell layer, with a primary cilium contacting the ventricle and long basal processes often contacting blood vessels (Figs. 1i, j, 3f and data not shown). These cells are likely NSCs (named B1 cells in the SVZ). Ependymal cells were not traced (Fig. 1i), suggesting that the *Prss56* gene is not expressed in this population. In addition to NSCs, numerous traced neuroblasts expressing DCX and migrating in chains were identified in the SVZ (data not shown) and the RMS (Fig. 1k). Finally, traced interneurons were observed in different layers of the OB (Fig. 1b, l) and BrdU labeling confirmed that some of these neurons were generated during adulthood (Fig. 1l).

In conclusion, our data indicate that the *Prss56^{Cre}* allele allows specific tracing of adult NSCs and their derivatives in the DG and the SVZ.

***Prss56^{Cre}*-traced cells participate in DG development**

In the adult DG, *Prss56^{Cre}*-traced cells include granule neurons, astrocytes and type I NSCs. To investigate the origin of these cells, we followed labeled cells during brain development. The first labeled cells are observed around E13.5 and correspond to radial glia located in the dVZ of the prospective DG (Fig. 2a-c). These cells express Nestin and Sox2 (data not shown) and show a radial morphology, with a soma in the dVZ and a long process extending to the pial surface (Fig. 2a and data not shown), indicating that they belong to radial glia. At this stage, radial glia of the medial pallium are the only traced cells in the forebrain neuroepithelium (data not shown) and most of them are located near the cortical hem (Fig. 2a-c). These data suggest that *Prss56* activation occurs in the medial pallium around E13.5. As many aspects of the continuous neurogenesis occurring in the DG are still poorly known

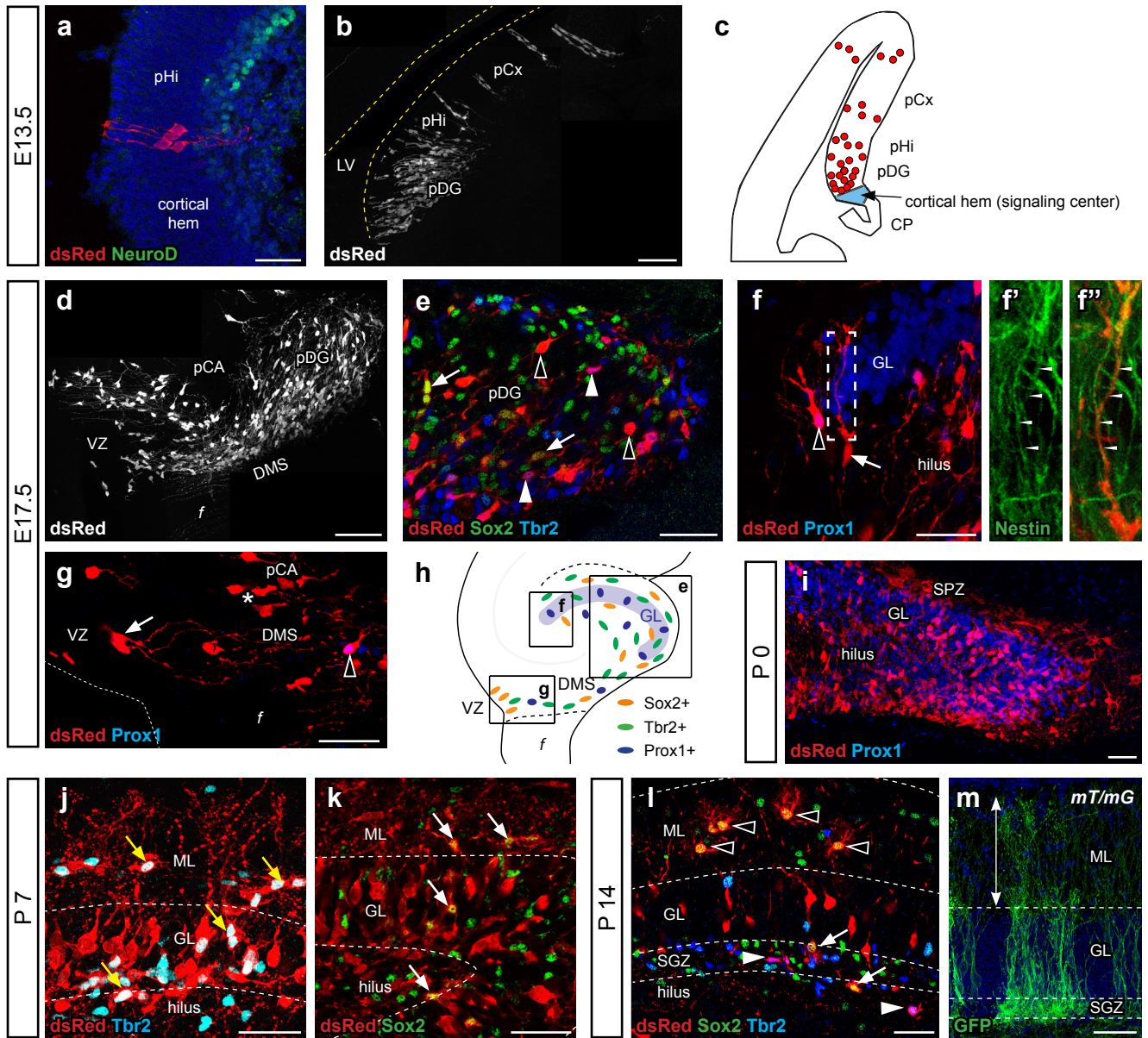


Figure 2. Derivatives of *Prss56*-expressing cells participate in DG development. **a, b** Coronal confocal optical slice (**a**) and thick section (**b**) through E13.5 *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} medial pallium, showing traced (red in (**a**)) cells localized in the prospective DG (pDG), close to the cortical hem identified by the absence of *NeuroD* in (**a**). **c** Schematic representation of the distribution of traced cells (red) in the developing pallium. **d-g** Coronal confocal images from different regions of E17.5 *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} prospective DG, showing a stream of traced cells extending from the ventricular zone (VZ) to the pDG in (**d**). Traced (red) cells in the pDG express the progenitor markers *Sox2* (**e**, arrows) or *Tbr2* (**e**, arrowheads), or the immature neuronal marker *Prox1* (**f**, empty arrowhead). *Tbr2*- and *Sox2*-negative traced cells in (**e**) are indicated by empty arrowheads. Some of the traced cells in the pDG retain radial glia morphology (**f**, arrow) and express *Nestin* (**f'**, **f''**, arrowheads). In (**g**), in addition to radial cells (arrow), *Prox1*-positive traced immature granule neurons are observed near the VZ (empty arrowhead), and *Prox1*-negative traced cells are found in the presumptive territory of CA3 (asterisk). **h** Schematic representation of traced cells' expression patterns during the formation of the DG. Insets indicate the positions of the pictures in (**e-g**). **i-k** Coronal confocal images of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P0 DG (**i**) and P7 (**j, k**) showing numerous traced (red) cells in the hilus, granular layer and subpial zone, which will give rise to the molecular layer. The different layers are delimited by dotted lines. Note that traced *Tbr2*-positive (**j**, arrow) and *Sox2*-positive (**k**, arrow) progenitors are present in all layers at P7. **l** coronal optical slice of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P14 DG showing *Sox2*-positive traced (red) cells in the molecular layer with the bushy morphology of astrocytes (empty arrowheads). In the granular layer, most traced cells are *Sox2*- and *Tbr2*-negative and have a bright circular soma characteristic of granule neurons. Traced *Sox2*-positive (arrows) and *Tbr2*-positive (arrowheads) progenitors are mainly restricted to the hilus and the forming SGZ. **m** Coronal confocal image of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mT/mG/+} P14 DG showing the presence of traced (green) radial glia-like type I NSCs with a soma located in the SGZ and cytoplasmic extensions crossing the granular layer toward the pial surface of the molecular layer (double arrow). CP, choroid plexus; DMS, dentate migratory stream; f, fimbria; GL, granular layer; ML, molecular layer; pCA: prospective territory of CA3 fields; pCx, prospective cortex; pDG, prospective dentate gyrus; pH prospective hippocampus; SGZ, subgranular zone; SPZ, subpial zone; VZ, ventricular zone. Scale bar 100 μm (**b, d**) and 40 μm (**others**).

(Urbán and Guillemot, 2014), we analyzed the participation of traced radial glia to DG development and generation of postnatal type I NSCs. At E17.5, traced cells form a continuous stream extending from the dVZ to the prospective DG (Fig. 2d). Most of these cells express markers of radial glia (Nestin and GFAP), neuronal progenitors (Sox2 and Tbr2) and/or immature granule neurons (Prox1) (Fig. 2 e-h; Supplemental Fig. 2a, b), indicating that traced cells contribute to the neuronal lineage (Hodge et al., 2012; Iwano et al., 2012). In the dVZ, traced Prox1-positive cells are often observed in proximity with traced, Nestin-positive, radial glial cells (Fig. 2g and data not shown). In the forming DG, traced Sox2- or Tbr2-positive progenitors do not show specific organizations and are present around and within the prospective granule layer (Fig. 2e, h). Interestingly, traced cells expressing Nestin (Fig. 2f, f') or GFAP (Supplemental Fig. 2b) with a soma in the prospective DG might correspond to the so-called secondary radial glia that are believed to generate adult type I NSCs (Brunner et al., 2010). Altogether, these results suggest that a subpopulation of radial glia in the dVZ activates *Prss56* around E13.5 and generates derivatives that migrate toward the DG, where they give rise to local stem cells, progenitors and immature granule neurons (Fig. 2h).

After birth, traced cells are found in three distinct layers of the developing DG: the hilus, the granule layer, and the subpial zone that will give rise to the molecular layer in the adult DG (Fig. 2i) (Li et al., 2009). At postnatal day (P) 7, traced Sox2- and Tbr2-positive progenitors persist in those three layers (Fig. 2j, k; Supplemental Fig. 2c, d) and traced cells showing a radial morphology and expressing GFAP are observed in the DG (Supplemental Fig. 2c, e). At P14, traced cells have undergone important morphological and molecular modifications: Sox2-positive cells in the molecular layer adopt the “bushy shape” characteristic of astrocytes (Fig. 2l; Supplemental Fig. 2g). Traced cells in the granular layer mainly correspond to mature neurons (Fig. 2l). Tbr2- and Sox2-positive traced progenitors are mostly restricted to the forming subgranular zone and hilus (Fig. 2l). Finally, GFAP-positive, adult-like NSCs have established their soma in the SGZ and send radial extensions more apically into the molecular layer than their adult counterpart, suggesting that they have not yet completely matured (Fig. 2m; Supplemental Fig. 2f, h).

A recent study revealed that NSCs in the DG are spatially heterogeneous and might have different origins during embryogenesis (Li et al., 2013). We therefore analysed the distribution of the cells generated by *Prss56*-expressing radial glia in the adult DG. Traced granule neurons show a dorso-ventral asymmetry, with a higher concentration in the dorsal DG (Supplemental Fig. 2i-k). This was correlated with the distribution of traced type I NSCs, which were mostly found in the dorsal DG (Supplemental Fig. 2l, 231 ± 65 cells in dorsal

hippocampus *versus* 27 ± 12 cells in ventral hippocampus, $n=3$). However, such biased distribution was not observed for labeled astrocytes in the DG and oligodendrocytes in the *fimbria*, the white matter structure linked to the DG (Supplemental Fig. 2k, m, l and data not shown).

In conclusion, this analysis indicates that the *Prss56* gene is expressed in a subpopulation of radial glia around E13.5 in the dVZ. The pattern of migration and differentiation of their derivatives faithfully recapitulates the successive steps of morphogenesis and neurogenesis of the DG, indicating that these cells participate to its formation, although with an asymmetric final distribution. Our tracing system therefore allows following GFAP-positive radial stem cells from E13.5 to the adult stage.

Neural stem cells express *Prss56* in the postnatal ventral SVZ

During embryogenesis, radial glia is the major source of neurons and glia in the developing brain. After birth, the remnants of radial glia lining the lateral ventricle undergo profound morphological and molecular changes, giving rise progressively to ependymal and adult B1 stem cells between P6 and P15 (Tramontin et al., 2003; Merkle et al., 2004; Spassky et al., 2005). We investigated whether, as in the adult DG, traced adult B1 NSCs are derived from embryonic *Prss56*-expressing radial glia or whether *Prss56* activation occurs postnatally.

Using *in situ* hybridization, *Prss56* expression was not detected in the lateral wall of lateral ventricles at embryonic or postnatal stages until P7, and reached high levels between P14 and P90 (Fig. 3a). No signal was observed in the *Prss56*^{Cre/Cre} mutant (Fig. 3a). In agreement with these observations, no traced radial glia were found during embryogenesis and in neonates. However, at P2 a few traced neuroblasts were observed, migrating through the lateral wall and the RMS (Fig. 3b and data not shown) and settling in the OB (Supplemental Fig. 3a). Traced cells displaying the morphology of B1 cells were reproducibly observed only from P7. They show a ventral localization in the lateral wall and express the NSC markers Sox2 and Nestin (Fig. 3c). At P14, larger numbers of traced B1 cells are present in the ventral and medial lateral wall of the lateral ventricles (Fig. 3d), as well as chains of migrating, traced, DCX-positive neuroblasts (data not shown). Simultaneous appearance of *Prss56* mRNA and of traced B1 cells at around P7 indicates that the newly formed B1 cells are those that activate the gene, whereas absence of the mRNA in the dorsal wall and the RMS suggests that the gene is not expressed in the neuroblasts. At P90, traced B1 cells line the lateral wall of the lateral ventricles (Fig. 1b; Fig. 3e). Whereas at these stages traced B1 cells express GFAP (Fig. 1l, Supplemental Fig. 1e), at P7-14 all traced cells with B1

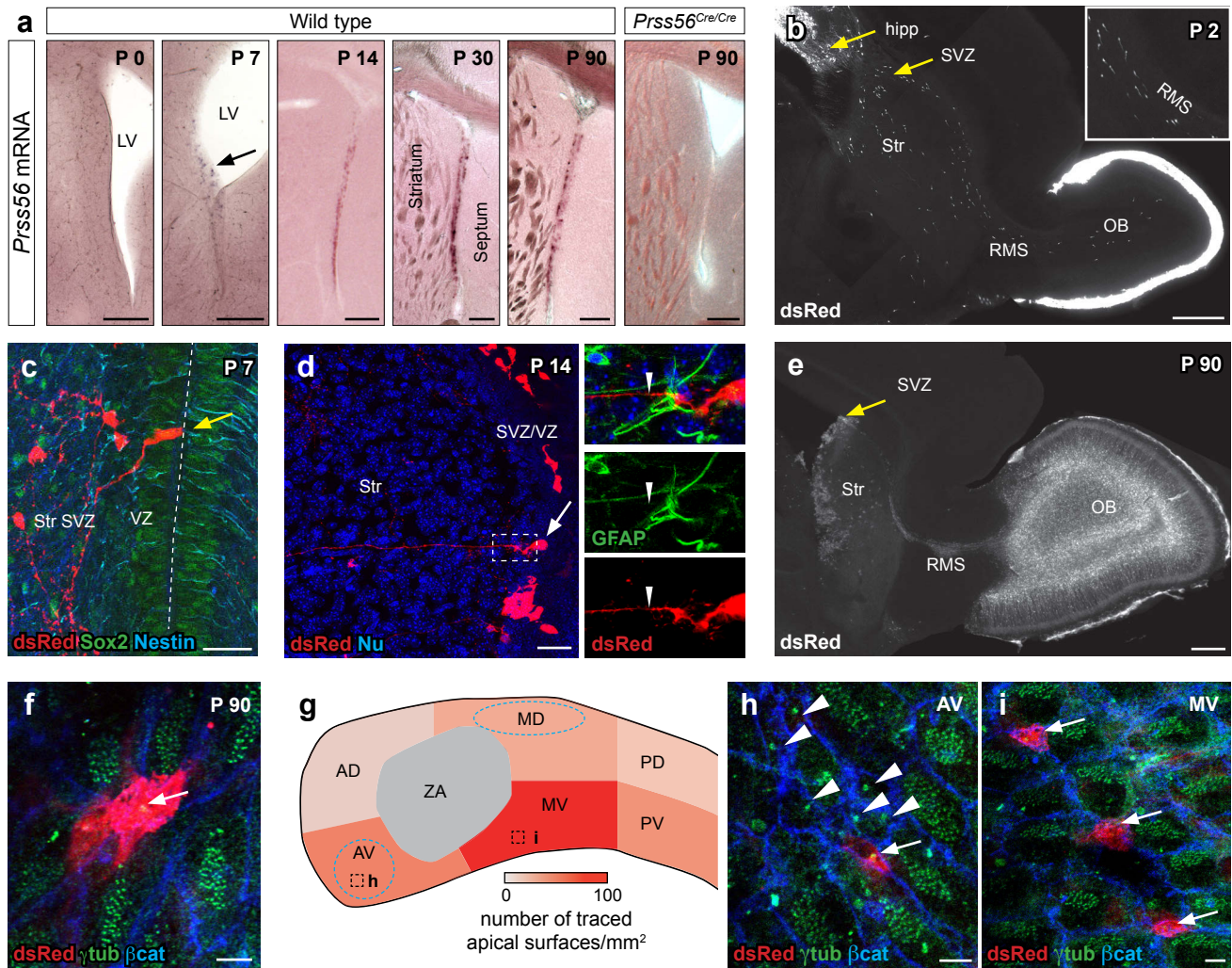


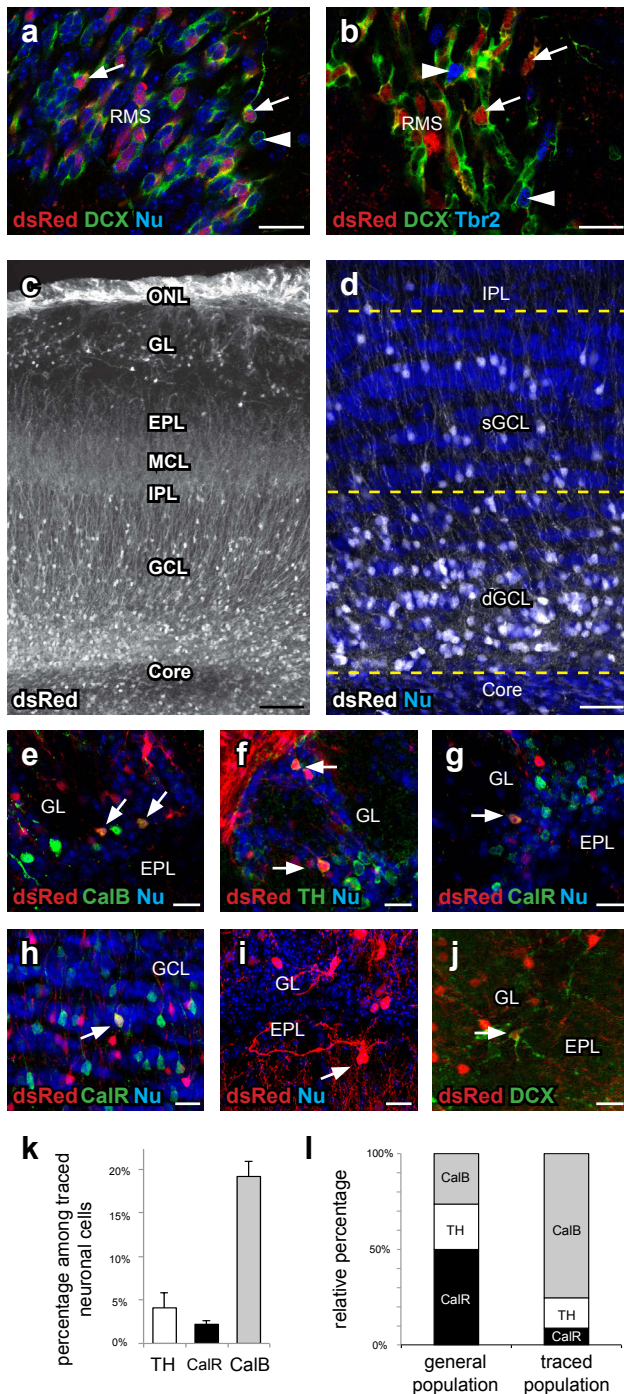
Figure 3. *Prss56* expression in postnatal neural stem cells in the ventral SVZ. **a** Detection of *Prss56* mRNA by *in situ* hybridization on coronal slices of wild type and *Prss56*^{Cre/Cre} brain at the indicated stages. **b** Parasagittal section of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P2 brain, showing the first traced cells migrating from the SVZ through the RMS toward the OB. The inset shows a magnification of the RMS. Note that labeled olfactory ensheathing cells are already present in the external part of the OB. **c** Coronal section through the ventral part of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P7 lateral ventricle showing the first traced (red), Sox2-positive, B1-like cells (arrow). **d** Coronal section of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P14 brain showing a traced (red), GFAP-negative, B1-like cells (arrow). Magnifications of the inset area, with separated colors are presented on the right. **e** Parasagittal slice of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P90 brain, showing traced cells in the SVZ (arrow), RMS and OB. **f** Whole mount preparation of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} adult lateral wall, showing the apical surfaces of traced (red) B1 NSCs on an optical slice of z confocal stack at the level of the ventricular surface. Note the pinwheel structure delineated by the membrane marker β -catenin and the presence of a single basal body marked by γ -tubulin (arrow). Ependymal cells are distinguished by the presence of multiple basal bodies and by their larger apical surface. **g** Schematic representation of the density of traced B1 apical surfaces in six regions of the lateral wall, indicated by red color intensity. Hot spots of density of B1 apical surfaces described by (Mirzadeh et al., 2008) are indicated by the blue dotted lines. The positions of **(h)** and **(i)** are indicated. Regions: AD, anterior-dorsal; AV, anterior-ventral; MD, medial-dorsal; MV, medial-ventral; PD, posterior-dorsal; PV, posterior-ventral; ZA, zone of adhesion (between lateral and median walls). **h** Representative optical slice of the anterior-ventral (AV) region of the lateral wall showing a unique traced B1 apical surface (arrow) in a pinwheel containing 6 non-traced B1 apical surfaces (arrowheads). **i** Representative optical slice of the medial-ventral (MV) region showing 3 isolated traced B1 apical surface (arrows). hipp, hippocampus; LV, lateral ventricle; OB, olfactory bulb; RMS, rostral migratory stream; Str, striatum; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone. Scale bar 400 μ m (**b**, **e**), 200 μ m (**a**), 30 μ m (**c**, **d**) and 5 μ m (**f**, **h**, **i**).

morphology express Nestin, but not GFAP (Fig. 3c, d). Ependymal cells are not traced (Fig. 3f). Taken together our data indicate that *Prss56* gene activation in the SVZ is concomitant with the postnatal transformation of radial glia into adult B1 NSCs, prior to the activation of the adult B1 marker GFAP.

During postnatal development, only a few traced cells were observed in the dorsal part of the lateral wall and none in the dorsal wall of the ventricle (Fig. 3e, and data not shown). *Prss56* expression pattern shows a similar ventral and medial distribution (Fig. 3a). We investigated whether this situation was maintained in adulthood. We found that *Prss56* was expressed in the adult lateral ventricle along the anterior-posterior axis, but was essentially excluded from the dorsal part of the lateral wall and the dorsal wall (Supplemental Fig. 3b). We studied the distribution of traced (tdTom-positive) B1 cells on whole-mount preparations of adult lateral wall (Fig. 3f), using labeling of ciliary basal bodies and of cell membranes at the apical surface to identify B1 cells, as described previously (Mirzadeh et al., 2008). We measured the distribution of tdTom-positive apical surfaces within six subregions (Fig. 3g). We found a difference with the published, general distribution of B1 cells (Mirzadeh et al., 2008). Traced B1 cells were most abundant in a medial-ventral region (91.8 ± 66.5 tdTom-positive apical surface/mm², n=3; Fig. 3g-i), whereas anterior-ventral and median-dorsal regions, known as enriched in B1 cells, showed lower levels of traced B1 cells (56.5 ± 39.1 and 35.6 ± 28.2 tdTom-positive apical surface/mm², n=3 ; Fig. 3g). A similar bias was observed in the dorsal-ventral distribution of BrdU-labeled, tdTom-positive cells that stay in the SVZ over a three months period and are likely to correspond to B1 cells (Supplemental Fig. 3c). Together, these data indicate that *Prss56* is preferentially expressed in a ventral subpopulation of stem cells in the postnatal SVZ.

Traced SVZ stem cells give rise to deep GC and CalB-positive PGC in the adult OB

Several studies have shown that the fate and localization of newborn interneurons in the mouse OB is determined by the position of their progenitor B1 stem cells in the lateral wall (Stenman et al., 2003; Kohwi et al., 2007; Merkle et al., 2007; Young et al., 2007; Brill et al., 2009; Merkle et al., 2014). For instance, ventral B1 cells generate mainly Calbindin (CalB)-positive PGCs and deep GCs, whereas dorsal B1 cells generate mainly tyrosine-hydroxylase (TH)-positive PGCs and superficial GCs, as well as some glutamatergic juxtglomerular neurons (Merkle et al., 2007; Brill et al., 2009). Since we have shown that traced B1 cells are unevenly distributed in the SVZ, we examined their derivatives in the adult RMS and OB.



We first analyzed traced RMS neuroblasts. In coronal sections through the RMS from 3 months-old animals, $22.6 \pm 2.7\%$ ($n=3$) of the DCX-positive cells were traced in *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}* mice (Fig. 4a), indicating that traced B1 cells significantly contribute to the neurogenic activity of the SVZ niche. No significant difference was observed at different positions along the RMS (data not shown). Part of the neuroblasts generated in the dorsal SVZ are known to express the transcription factor Tbr2 and to differentiate into glutamatergic juxtglomerular neurons (Brill et al., 2009). We detected almost no Tbr2-positive traced neuroblasts in the RMS (only one cluster of 7 traced, Tbr2-positive neuroblasts among 915 Tbr2-, DCX-positive cells, $n=3$; Fig. 4b), suggesting that traced B1 cells do not participate in the generation of glutamatergic neurons.

In the OB granule cell layer, the majority of traced neurons corresponded to deep GCs (Fig. 4c, d). In the glomerular layer, the proportions of traced cells with a neuronal morphology and expressing TH, CalB or Calretinin (CalR) (Fig. 4e-g) were determined, revealing a much higher proportion of CalB-positive neurons ($19.8 \pm 4.8\%$) than TH-positive ($4.0 \pm 4.3\%$) or CalR-positive neurons ($2.2 \pm 1.7\%$), in contrast to the general neuronal distribution ($n=4$, Fig. 4l, m). This analysis also revealed that most (75%) of the traced PGCs did not express any of the three markers. Accordingly, it was previously shown, using a tracing based on the expression of *Dlx1/2* in the ventral SVZ, that many traced interneurons are not positive for any of these markers (Batista-Brito et al., 2008). A few traced neurons were also observed at the level of the external plexiform layer and have a morphology similar to the recently described type 4 cells (Fig. 4i, (Merkle et al., 2014)). Finally, traced DCX-positive neuroblasts were also observed in different layers and represented approximately 6% of the traced neuronal progeny in the glomerular layer (Fig. 4j). In conclusion, these data indicate that traced B1 cells generate a large variety of neuronal populations, present in the different layers of the OB after birth. This neurogenic potential is nevertheless restricted and determined by the medial-ventral localization of traced B1 cells in the SVZ.

In the OB, traced cells were also observed in the olfactory nerve layer (ONL) and correspond to olfactory ensheathing cells (OEC) (Fig. 1b; Fig. 3b, e; Supplemental Fig. 3a). *Prss56* expression is initiated in the ONL at around E13.5 and persists in the adult (Supplemental Fig. 4a-c). OECs are a heterogeneous population of cells, with a subpopulation derived from the neural crest and expressing *Sox10* (Barraud et al., 2010; Forni et al., 2011). Traced OECs were found to express *Sox10* from E13.5 to adulthood (Supplemental Fig. 4d-f). They are restricted to the inner ONL and absent from the olfactory nerve (Supplemental Fig.

4a, d). In the adult, they are positive for BLBP, but not GFAP (Supplemental Fig. 4f, g). These results indicate that *Prss56* constitutes a marker for a neural crest-derived OEC subpopulation in the CNS.

***Prss56* is expressed in a subpopulation of tanycytes in the adult hypothalamus**

Emerging evidence indicates that new neurons are generated in the adult hypothalamus, suggesting the existence of a local neurogenic niche (Robins et al., 2013). We investigated the expression of *Prss56* by *in situ* hybridization in the adult and found that it is transcribed in the ventricular region of the third ventricle, at the level of the arcuate nucleus (Fig. 5a; Supplemental Fig. 5a, b). Tracing of *Prss56*-expressing cells revealed the presence of labeled cells in the same region of the postnatal and adult hypothalamus (Fig. 5b, c; Supplemental Fig. 5c). The traced cells correspond to tanycytes: they line the ventricular wall of the ventral third ventricle, express tanycytes markers like Vimentin (Fig. 5d, e) and Nestin (Supplemental Fig. 5d) and send a single radial extension toward the parenchyma, often contacting blood vessels (Fig. 5b-e and data not shown). These traced tanycytes are located in a specific region, extending from the anterior part of the arcuate nucleus to the posterior part of the periventricular nucleus, and below the median mammillary nucleus (Supplemental Fig. 5e, e'). Consistent with *Prss56* mRNA localization, no traced tanycytes were observed in the medial eminence and the ventromedial nucleus, and only a few were found scattered in the dorsomedial nucleus (Fig. 5b; Supplemental Fig. 5e, e'). This particular location of the traced tanycytes suggests that most of them belong to the $\alpha 2$ subtype (Fig. 5f). Previous studies have shown that GFAP is only expressed in dorsal $\alpha 2$ and in a fraction of the $\alpha 1$ tanycytes (Haan et al., 2013; Robins et al., 2013). At the level of the arcuate nucleus, traced tanycytes are located just below the GFAP-positive tanycyte population, but never express this marker (Fig. 5e and Supplemental Fig. 5c). In the adult brain, the traced tanycytes (421 ± 104 cells per hypothalamus, n=3) represent a small proportion of the Vimentin-positive tanycytes (Fig. 5d, e). Together, these results indicate that *Prss56*-expressing cells in the hypothalamus belong to a ventral GFAP-negative subpopulation of $\alpha 2$ tanycytes (Fig. 5f).

Consistent with the distribution of the traced tanycytes, many traced neuronal cells were observed in the postnatal arcuate and dorsomedial nuclei, whereas the medial eminence and the ventromedial nucleus were mostly free of traced cells (Fig. 5f, g; Supplemental Fig. 5e and data not shown). In addition, a few Sox2-positive astrocytes were also traced in the

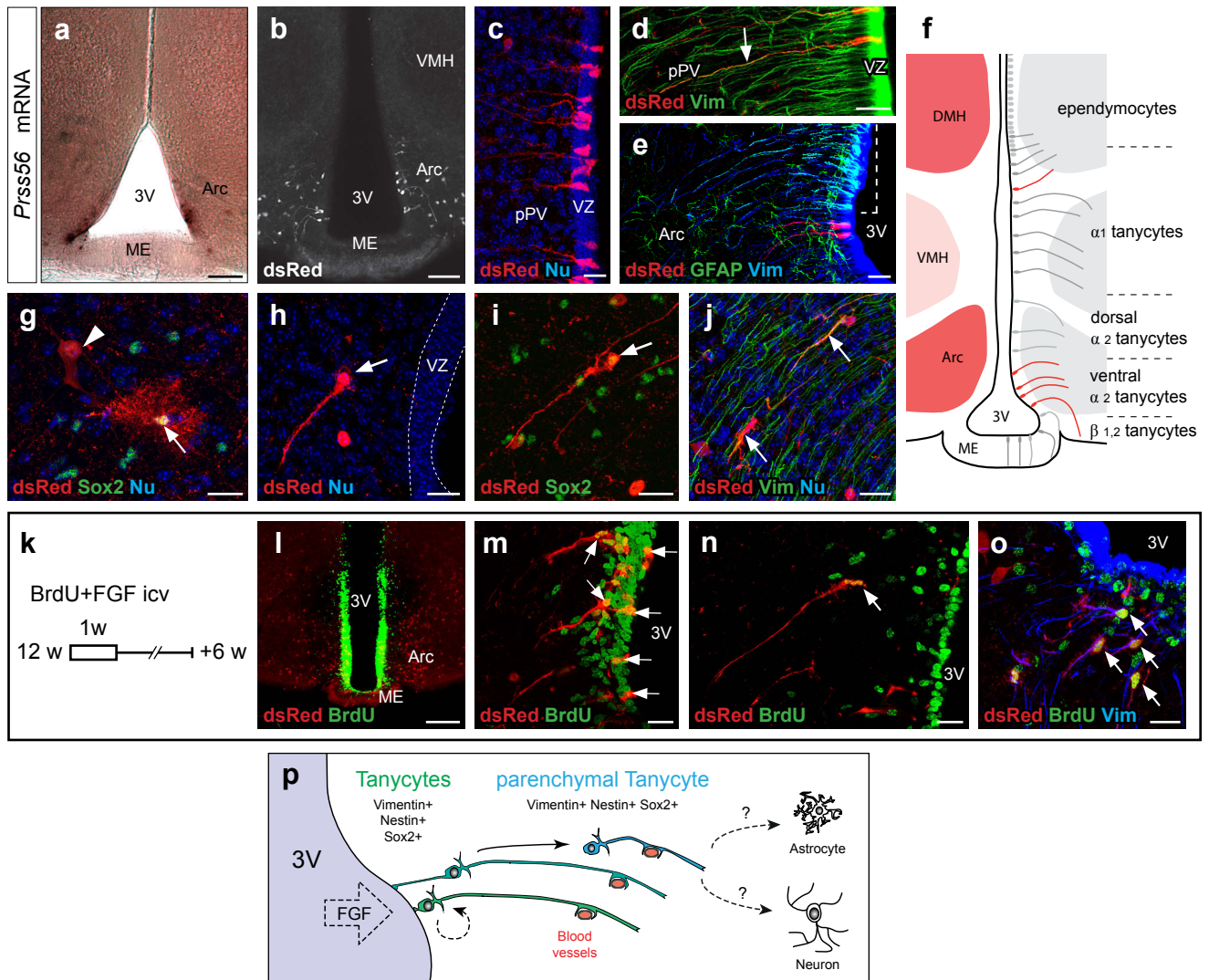


Figure 5. *Prss56* is expressed in a subpopulation of tanycytes in the adult hypothalamus. **a** Detection of *Prss56* mRNA by *in situ* hybridization on a coronal slice of adult hypothalamus showing *Prss56* expression in the ventricular zone at the level of the arcuate nucleus. **b** Coronal slice of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain showing traced cells in the arcuate nucleus but not in the median eminence and the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **c** Confocal image of an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain at the level of the periventricular nucleus showing traced (red) tanycytes with a soma lining the third ventricle and a radial morphology. **d** Confocal image of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain, showing traced tanycytes (red) that express Vimentin (arrow). **e** Optical confocal slice of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain at the level of the arcuate nucleus showing that traced (red) tanycytes do not express *GFAP* and are localized ventrally to the *GFAP*-positive region indicated by a dotted line. **f** Schematic representation of the distribution of traced (red) tanycytes (on the right) along the ventricle and of traced neurons within the nuclei of the mediobasal hypothalamus (red and pink nuclei on the left). **g**, Confocal image of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain showing a traced (red) Sox2-positive astrocyte (arrow) and a traced Sox2-negative neuron (arrowhead) in the parenchyma. **h** Morphology of a traced (red) tanycyte-like cell (arrow) outside of the ventricular zone (indicated by dotted line) in the parenchyma. **i** Optical slice of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain showing a traced (red) Sox2-positive parenchymal tanycyte-like cell (arrow). **j** Confocal stack from an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} brain showing traced (red) parenchymal, Vimentin-positive tanycyte-like cells (arrows). Note the common direction of the extensions of the traced parenchymal and ventricular tanycyte-like cells. **k-o** BrdU labeling of proliferating hypothalamus cells. BrdU and FGF-2 were infused in the ventricular system of adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} animals during seven days and tissues were harvested 6 weeks afterwards as schematized in (**k**). **l** Coronal slice at the level of the arcuate nucleus showing tracing (red) and BrdU labeling (green). **m** Confocal image showing a high number of BrdU-positive nuclei, including those of traced (red) tanycytes, in the thickened VZ due to FGF mitogen exposure. **n, o** Confocal images showing BrdU-positive traced (red) parenchymal tanycyte-like cells (arrows), Vimentin-positive in (**o**). **p** Schematic representation of the generation of parenchymal tanycyte-like cells by nuclear translocation of ventricular tanycytes. 3V, third ventricle; Arc, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial nucleus; icv, intracerebroventricular infusion; ME, median eminence; pPV, posterior part of the periventricular nucleus; VMH, ventromedial nucleus; VZ, ventricular zone. Scale bar 200 μ m (**l**), 100 μ m (**a, b**) and 20 μ m (**c-j, m-o**).

same areas (less than 10 astrocytes per mediobasal hypothalamus, $n=5$; Fig. 5g). These data suggest that traced $\alpha 2$ tanycytes could generate neurons in the arcuate and dorsomedial nuclei after birth.

In the parenchyma, we also observed traced cells that had the elongated morphology of tanycytes, but with a cell body located 60-100 μm away from the ventricular surface and an extension perpendicular to this surface (Fig. 5 h-j). These cells are positive for the tanycytes markers Sox2, Vimentin and Nestin (Fig. 5h, i; Supplemental Fig. 5d). To our knowledge this parenchymal tanycyte-like population has not been previously described and may correspond to ventricular tanycytes that have translocated their soma into the parenchyma. To determine whether traced adult tanycytes proliferate and can indeed generate these parenchymal tanycyte-like cells, BrdU and FGF2 were infused in the brain of 3 months old mice, as FGF2 has been reported to stimulate proliferation of tanycytes (Robins et al., 2013). Six weeks after infusion (Fig. 5k), we observed numerous BrdU-positive cells in the third ventricular wall, especially at the level of the arcuate nucleus (Fig. 5l). Traced tanycytes efficiently incorporated BrdU (Fig. 5m). We also observed BrdU-labeled traced cells corresponding to the parenchymal tanycyte-like population, as well as tanycyte-like cells with intermediate positions between the latter and the ventricular surface (Fig. 5m-o and Supplemental Fig. 5f, f'). We verified that, under such mitogenic stimulation, the parenchymal BrdU-positive tanycyte-like cells express Vimentin, Nestin and Sox2, and do not express GFAP, NG2 or DCX (Fig. 5o; Supplemental Fig. 5g-j and data not shown). Taken together our data suggest that the $\alpha 2$ tanycytes are able to migrate into the parenchyma, in physiological conditions and upon mitogenic stimulation.

DISCUSSION

Since the pioneering experiments of Ezra Allen (Allen, 1912) and Joseph Altman (Altman and Das, 1965b; 1965a), adult neurogenesis is recognized as a natural process in the brain. Although it provides only a small fraction of new neurons in specific regions of the brain, these neurons are necessary for many physiological brain functions, such as learning, memory and mood regulation (Zhao et al., 2008). Because it involves very limited cell populations embedded in complex niches, the study of adult neurogenesis has heavily relied on specific labeling procedures. In this report, we describe a novel tracing system, based on the *Prss56* gene, which allows the identification of NSCs and their derivatives in three neurogenic niches of the adult brain. This system as well as future genetic tools based on the *Prss56* locus should therefore constitute interesting approaches to investigate various aspects of adult neurogenesis in the mouse.

NSCs within each niche show regional variations, reflecting distinct embryonic origins and supporting different neuronal fates (Stenman et al., 2003; Kohwi et al., 2007; Merkle et al., 2007; Young et al., 2007; Brill et al., 2009; Merkle et al., 2014). Although traced NSCs were detected in the three adult neurogenic niches, only a minor proportion of NSCs population are traced in each niche. This specificity seems to rely on the location of the NSCs within each niche. This restriction might constitute an advantage for identification, isolation, and analysis of the fate and function of specific NSC populations. Finally, our tracing system revealed important differences in the timing of activation of *Prss56* in different niches. Whereas in the hippocampus tracing is first observed at E13.5 in radial glial cells, in the SVZ the *Prss56* gene is activated during the second week after birth when the radial glia transformed into B1 NSCs. These differences are likely to reflect specificities in the regulation and function of *Prss56* in the different niches.

Our study also revealed major differences in the behavior of two reporters *Rosa26^{mT/mG}* and *Rosa26^{tdTom}*. The localization of the reporter, membrane-targeted for EGFP, and cytoplasmic for tdTom, affect the visualization of NSCs and neurons in opposite and dramatic manners. Those differences suggest also variations in levels of the reporter proteins in different cell types especially in type I NSC in the adult DG where the level of the tdTom protein seems extremely low. Our data therefore highlight the importance of the choice of the reporter gene in fate mapping studies. They provide indications for the most appropriate one

in studies of NSCs and their derivatives and argue in favor of testing several reporters in other cases.

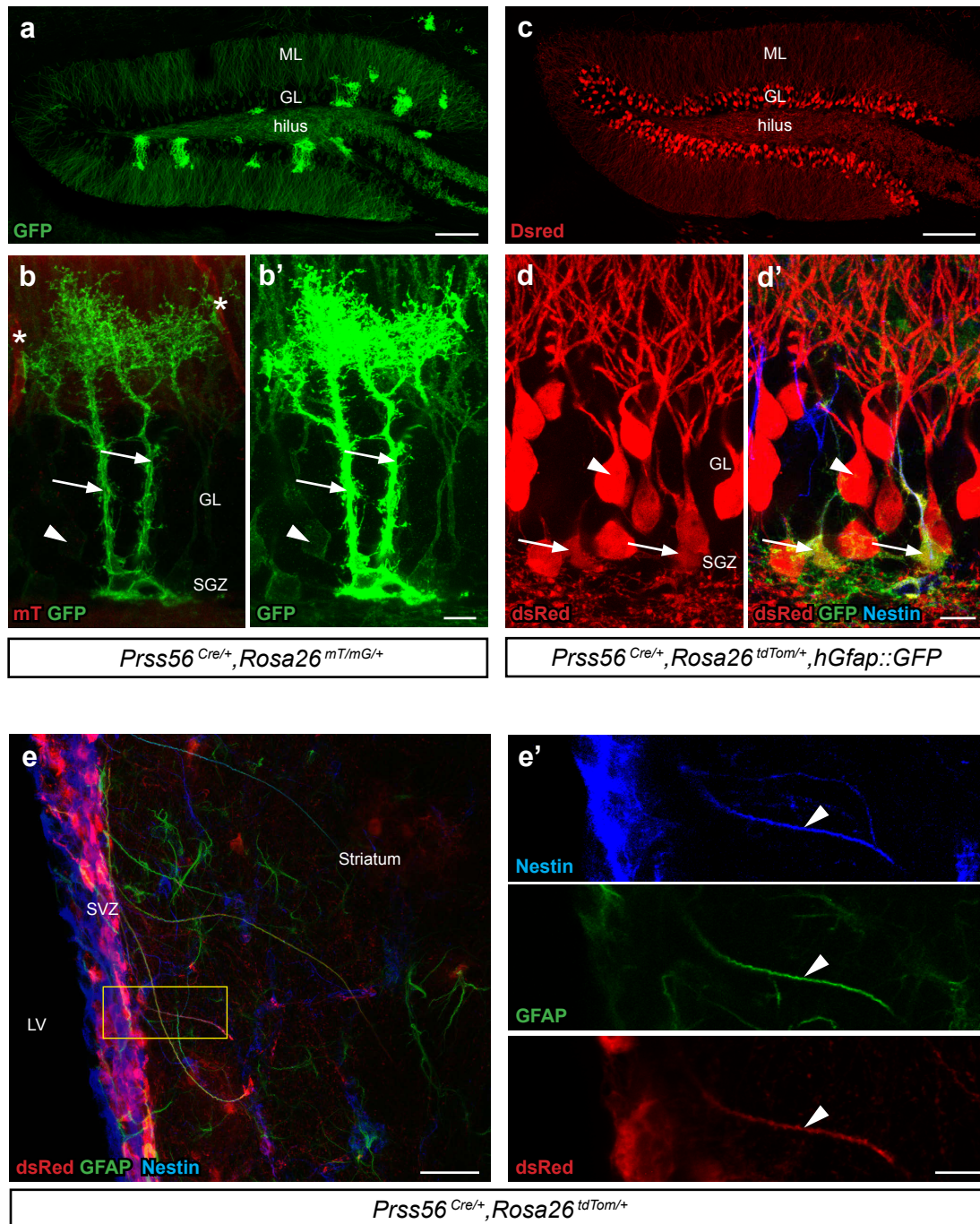
The DG originates from stem/progenitor cells of the dVZ in the medial pallium, which migrate during late stages of embryonic development to the pial side of the median cortex and the hippocampal fissure (Urbán and Guillemot, 2014). These cells show astrocytic features, express GFAP and Nestin and will form the SGZ in perinatal and postnatal periods (Seri et al., 2001; Fukuda et al., 2003; Liu et al., 2010; Seki et al., 2013). This classical model presumes that the adult DG contains a homogenous pool of NSCs that have been generated during embryonic development. Recently, long-term fate mapping have shown that, in the perinatal period, cells from the ventral hippocampus respond to sonic hedgehog and migrate to the dorsal region, establishing a pool of NSCs in the adult SGZ (Li et al., 2013). This study suggests that, as for the SVZ, the DG is a mosaic structure, with NSCs from different origins (Merkle et al., 2007; Li et al., 2013). Our data support the classical model since they indicate that the traced adult NSCs are generated from a subpopulation of radial glia of the neuroepithelium that migrate to the DG in the late embryonic period. However, since only a fraction of the NSCs are traced and are more abundant in the dorsal region, our data are also consistent with the existence of heterogeneity in the pool of adult NSCs in the SGZ. The *Prss56*^{Cre} allele provides the first endogenous system allowing specific tracing of DG radial glia subpopulations. It should therefore constitute an appropriate tool to ablate genes involved in different aspects of this particular process of neurogenesis (e.g. quiescence, migration, differentiation...), without compromising the development of the DG.

In the SVZ, the activation of *Prss56* and the appearance of the first traced B1 cells occur during the second postnatal week, simultaneously with the transformation of radial glial cells into adult NSCs (Tramontin et al., 2003; Merkle et al., 2004). This suggests that, in this territory, expression of *Prss56* is specific to adult NSCs. However, nothing is known about the regulation of this gene. Whereas adult NSCs that generate OB interneurons are present in different walls of the lateral ventricles and in the RMS (Alonso et al., 2008; Mirzadeh et al., 2008), the expression of *Prss56* is restricted to the ventral and medial regions of the lateral wall, with a pattern similar to that of *Gli1* in the adult (Ihrle et al., 2011). This raises the possibility that *Prss56*, like *Gli1*, may respond to sonic hedgehog signaling. Although traced B1 cells generate a large variety of neuronal populations, present in the different layers of the OB after birth, most of the traced neurons are deep GC and Calbindin-positive PGCs. This is in agreement with the higher density of traced B1 cells in the ventral portion of the lateral

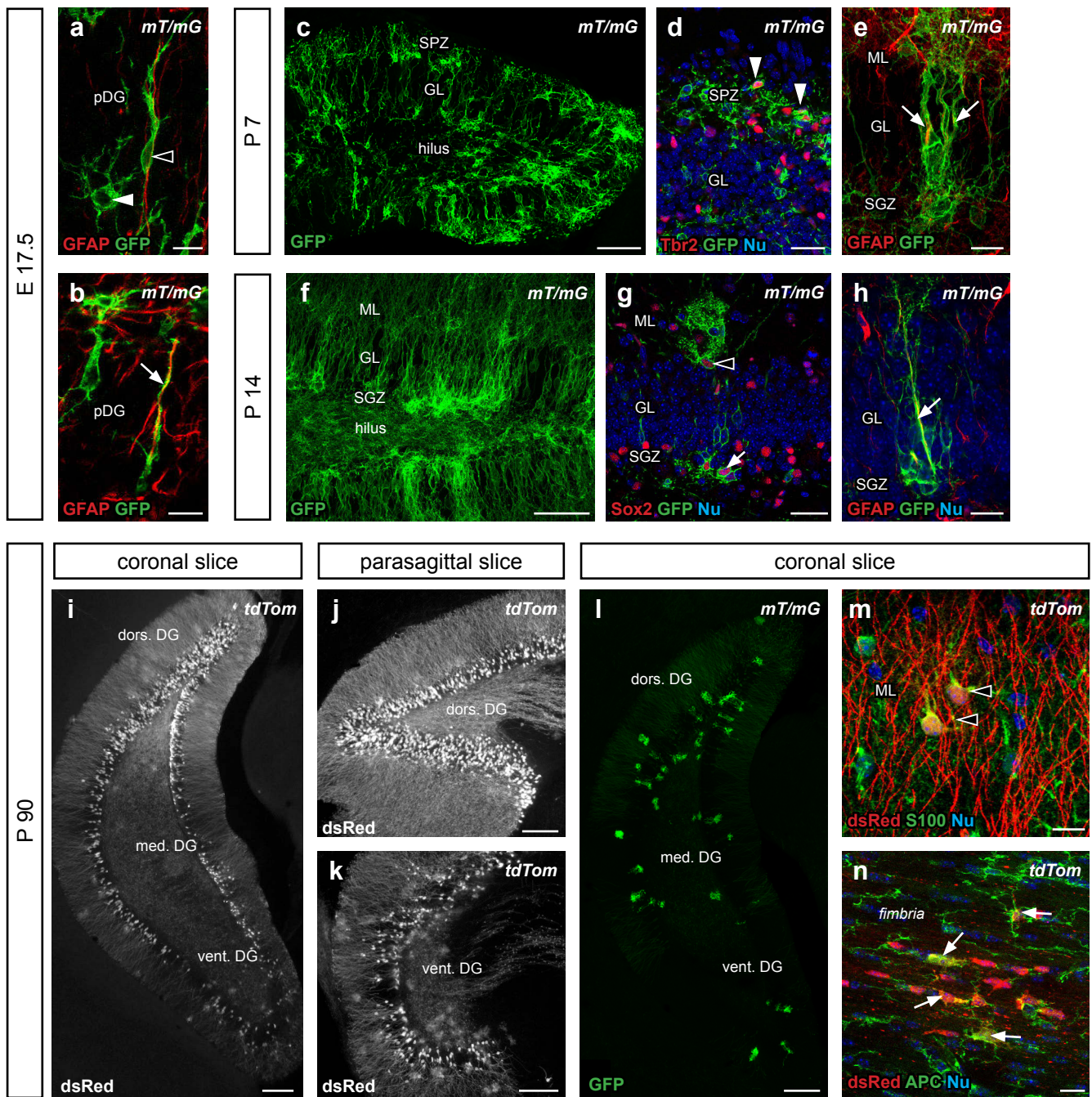
wall, which is known to preferentially give rise to these two types of neurons (Merkle et al., 2007).

The discovery of postnatal neurogenesis in the hypothalamus and of the involvement of tanycytes in this process is recent (Sousa-Ferreira et al., 2014). This structure is important for numerous physiological and behavioral functions, and feeding has certainly attracted the greatest attention (Pierce and Xu, 2010; Lee and Blackshaw, 2012; Li et al., 2012; Sousa-Ferreira et al., 2014). However, the contribution of postnatal neurogenesis to these functions remains to be established. Such a demonstration and more generally the study of neurogenesis in this region is challenging because the tanycytes divide very slowly and it is difficult to perform viral labeling or genetic fate mapping that target these specific populations. Using the *Prss56^{Cre}* tracing system, we have traced a subpopulation of GFAP-negative $\alpha 2$ tanycytes and observed traced neurons in the arcuate nucleus, suggesting that these cells might belong to the same lineage. Furthermore, we also observed labeled parenchymal tanycyte-like cells that have not been previously described. BrdU labeling combined with FGF infusion suggests that these parenchymal tanycyte-like cells might originate from the ventricular tanycytes by translocation of their soma into the parenchyma (Fig. 5p). It would be important to determine whether this translocation is a necessary step in the generation of neurons or the parenchymal tanycytes play a specific role in the parenchyma. Our tracing system should be helpful to investigate this issue and more generally neurogenesis in the hypothalamus.

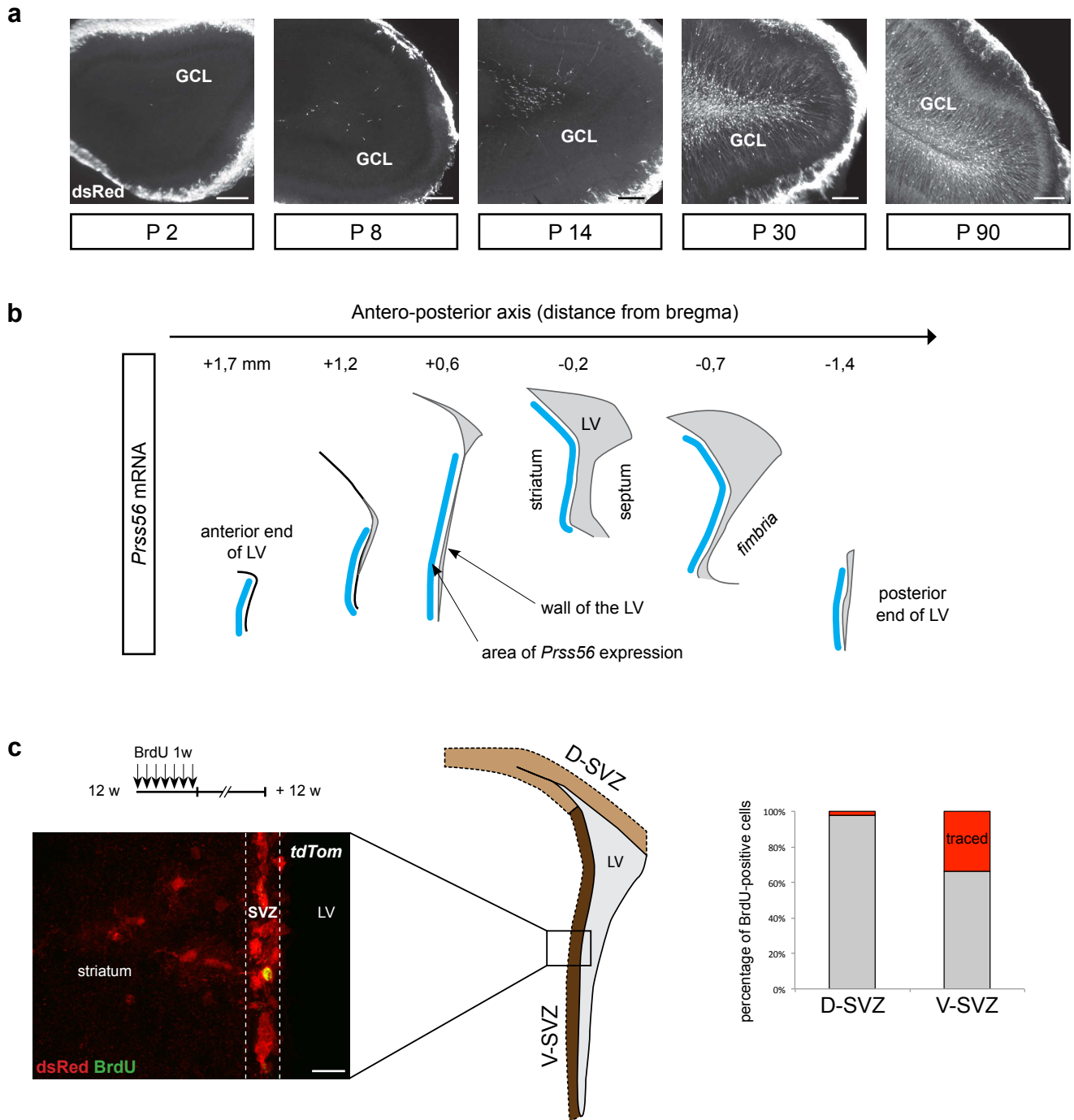
A number of studies, using various methodological approaches, such as ^3H -thymidine autoradiography, BrdU labeling or neurosphere formation, have reported the presence of new neurons and progenitor cells in multiple brain regions outside the SGZ, the SVZ and the hypothalamus. These regions include the basal forebrain (Palmer et al., 1995), the striatum (Reynolds et al., 1992; Pencea et al., 2001), the amygdala (Rivers et al., 2008), the substantia nigra (Lie et al., 2002) and the subcortical white matter (Nunes et al., 2003). However, these findings have been received with skepticism and the question of the existence of adult neurogenesis in these regions remains open (Gould, 2007; Lee and Blackshaw, 2012). In this report, we have shown that the tracing system based on the *Prss56^{Cre}* allele allows us to follow adult NSCs and their derivatives in three documented neurogenic niches. It is conceivable that this system also labels adult NSCs in other niches and if so would constitute a valuable tool to investigate their neurogenesis in normal and pathological situations.



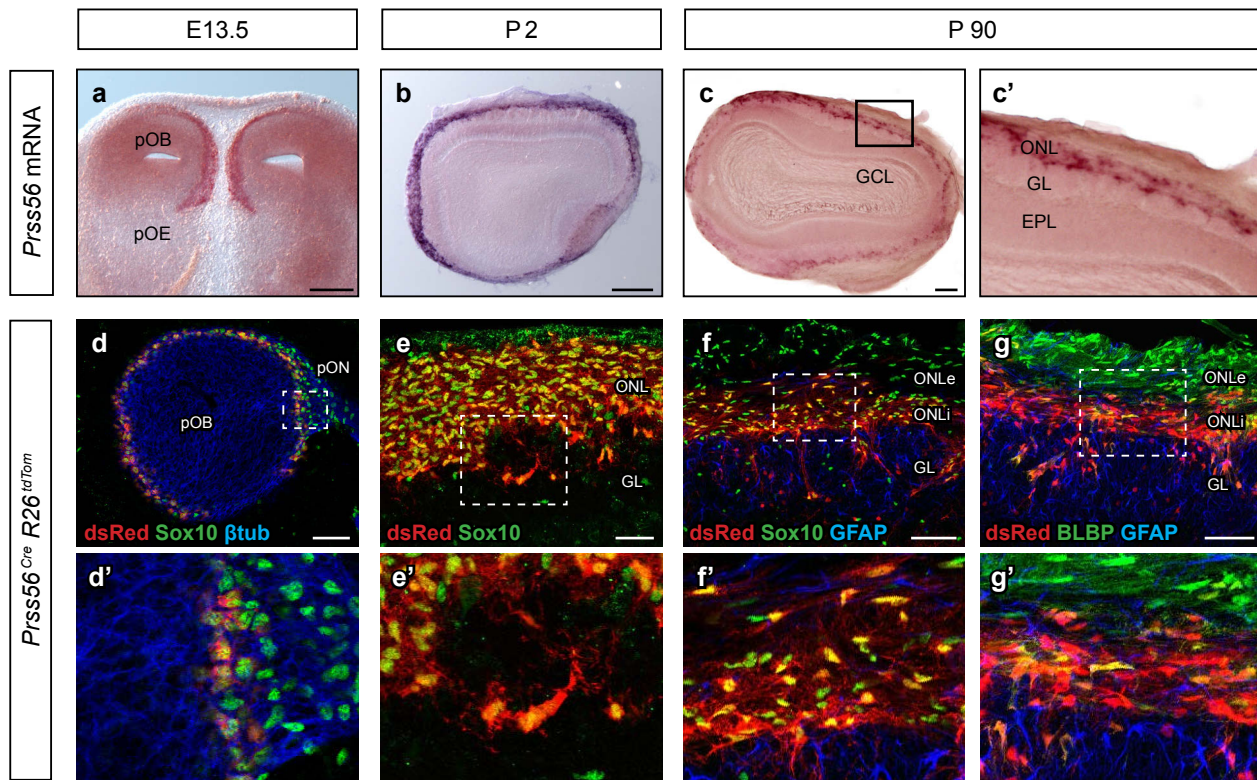
Supplemental Figure 1. Comparison between the *Rosa26tdTom* and *Rosa26mT/mG* reporters in the observation of derivatives of *Prss56*-expressing cells in the adult DG and SVZ. **a** Coronal section of a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* adult DG showing highly fluorescent traced (green) glial cells and neurites from traced granule neurons. **b** High-resolution confocal stack of radial type I NSCs (arrows) from a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* adult DG showing their complex arborization and their apical contacts with blood vessels (asterisks). **b'** Higher brightness image, showing the weakly fluorescent cell bodies of granule neurons (arrowhead). **c** Coronal view of a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}* adult DG showing traced (red) granule neurons. **d, d'** High-resolution confocal stack of *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}, hGFAP::GFP* mice showing weakly fluorescent (red) traced radial type I NSCs GFP- and Nestin-positive (arrows) compared to the highly-fluorescent (red) traced granule neurons (arrowheads). **e** Coronal confocal z stack of a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}* adult SVZ showing traced (red) B1 stem cells coexpressing GFAP and Nestin. **e'** Separate channels of an optical slice at the level of the boxed region in (**e**), showing the triple labeling. GL, granular layer; LV, lateral ventricle; ML, molecular layer; SGZ, subgranular zone; SVZ, subventricular zone. Scale bar 150 μ m (**a, c**), 30 μ m (**e**) and 10 μ m (**b, d, e'**).



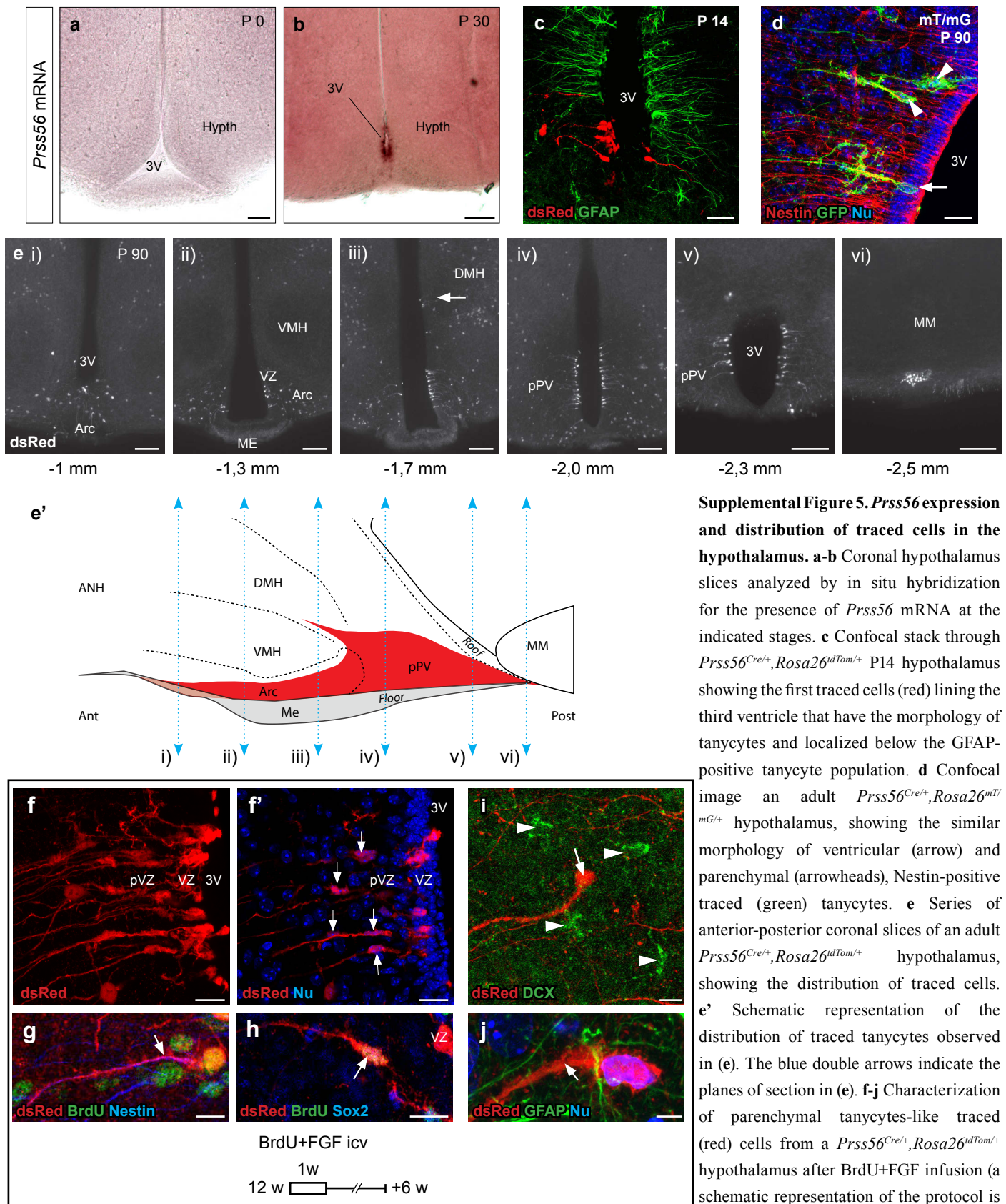
Supplemental Figure 2. Tracing of derivatives of *Prss56*-expressing cells during DG development and in the adult hippocampus. **a-b**, Optical slices through a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* E17.5 prospective DG showing a radially migrating traced (green) cell along a GFAP-positive filament (**a**, open arrowhead), a multipolar GFAP-negative traced (green) cell (**a**, white arrowhead) and a traced (green) extension positive for GFAP (**b**, arrow). **c-e**, Coronal confocal stacks (**c**, **d**) and optical slice (**d**) through a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* P7 DG showing numerous traced (green) cells in the hilus, GL and subpial zone (**c**). Some of these traced cells are positive for Tbr2 in the SPZ (**d**, arrowheads) or are GFAP-positive, radial cells in the GL (**e**, arrows). **f-h** Coronal confocal stack (**f**) and optical slices (**g**, **h**) through a *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* P14 DG, showing the presence of traced (green) adult-like radial type I NSCs (**f**), Sox2- (**g**, arrow) and GFAP-positive (**h**, arrow) in the SGZ and of Sox2-positive astrocytes in the ML (**g**, arrowhead). **i-n** Distribution of the different traced cell types in the *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}* (**i-k**, **m**, **n**) and *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{mT/mG/+}* (**l**) adult posterior hippocampus. Coronal (**i**, **l-n**) and parasagittal (**j**, **k**) slices, showing that traced granule neurons (**i-k**) and type I NSC (**l**) are preferentially located in the dorsal DG whereas traced (red) S100-positive astrocytes (**m**, open arrowheads) are more homogeneously distributed in the DG. **n** Image at the level of the *fimbria*, showing a cluster of traced cells positive for APC, a marker of mature oligodendrocytes (arrow). dors., med., vent. DG, dorsal, medial and ventral parts of the posterior dentate gyrus; GL, granular layer; ML, molecular layer; pDG, presumptive dentate gyrus; SGZ, subgranular layer; SPZ, subpial zone. Scale bar 200 μ m (**l**), 150 μ m (**i**, **j**), 70 μ m (**c**, **g**), 30 μ m (**d**, **g**) and 15 μ m (**a**, **b**, **e**, **h**, **m**, **n**).



Supplemental Figure 3. Distribution of the traced cells and *Prss56* mRNA in the OB and the SVZ. **a** Coronal sections of *Prss56^{Cre/+}, Rosa26^{tdTom/+}* OB at different postnatal stages showing the increase in traced neurons. **b** Schematic representation of the distribution of *Prss56* mRNA at different anterior-posterior levels of the lateral ventricle based on *in situ* hybridization analysis (n=3). Note that *Prss56* mRNA is not present in the dorsal part of the lateral wall nor in the dorsal and medial walls. **c** Analysis of long term retention of BrdU in the SVZ. The BrdU incorporation protocol is depicted on the top left. The lateral wall was divided in two parts: (i) the ventral and median SVZ of the lateral wall (V-SVZ) and (ii) the dorsal part of the lateral wall, the prolonging sub-callosal part of the SVZ and the dorsal wall (D-SVZ). Traced and non-traced BrdU-positive cells were quantified only in the SVZ, delineated in the left image, as assessed in confocal optical slices (n=3 animals). 97 and 315 BrdU-positive cells were counted in the D-SVZ and V-SVZ, respectively. Note that BrdU-positive cells might correspond to postmitotic cells or quiescent NSCs. LV, lateral ventricle; GCL, granule cell layer of the olfactory bulb; SVZ, subventricular zone. Scale bar 200 μ m (**a**, except P2 100 μ m) and 20 μ m (**c**).



Supplemental Figure 4. *Prss56* is expressed in a subpopulation of olfactory ensheathing cells in the inner olfactory nerve layer of the OB. **a-c'** Detection of *Prss56* expression by *in situ* hybridization in the prospective and adult OB at the indicated stages. **c'** shows a higher magnification of the external layer boxed in (**c**). **d-f** Confocal images of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} OB showing traced (red) Sox10-positive GFAP-negative OEC cells at the indicated stages. **g** Confocal images of *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} OB showing traced (red) BLBP-positive cells at P90. **d'-g'** Higher magnifications of the regions boxed in (**d-g**). EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GL, glomerular layer; ONL, olfactory nerve layer; iONL, inner ONL; oONL, outer ONL; pOB, prospective olfactory bulb; pOE, prospective olfactory epithelium; pON, prospective olfactory nerve. Scale bar 200 μ m (**a, b, c**), 80 μ m (**d, f, g**) and 40 μ m (**e**).



Supplemental Figure 5. *Prss56* expression and distribution of traced cells in the hypothalamus. **a-b** Coronal hypothalamus slices analyzed by in situ hybridization for the presence of *Prss56* mRNA at the indicated stages. **c** Confocal stack through *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} P14 hypothalamus showing the first traced cells (red) lining the third ventricle that have the morphology of tanycytes and localized below the GFAP-positive tanycyte population. **d** Confocal image of an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{mT/mG} hypothalamus, showing the similar morphology of ventricular (arrow) and parenchymal (arrowheads), Nestin-positive traced (green) tanycytes. **e** Series of anterior-posterior coronal slices of an adult *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} hypothalamus, showing the distribution of traced cells. **e'** Schematic representation of the distribution of traced tanycytes observed in (e). The blue double arrows indicate the planes of section in (e). **f-j** Characterization of parenchymal tanycytes-like traced (red) cells from a *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} hypothalamus after BrdU+FGF infusion (a schematic representation of the protocol is shown on the left). **f** Confocal z-stack showing numerous traced cells in the ventricular (VZ) and periventricular (pVZ) zones. **f'** Optical slice from (f) showing the localization of cell bodies of traced tanycyte-like cells in the pVZ (arrows). **g, h** Confocal images of traced, BrdU-positive parenchymal tanycyte-like cells expressing Nestin (**g**, arrow) and Sox2 (**h**, arrow). **i, j** Confocal images showing that traced (red) parenchymal tanycyte-like cell (arrows) do not express DCX (**i**, arrow) nor GFAP (**j**, arrow). Arrowheads in (**i**) indicate DCX-positive cells. Arc, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial nucleus; Hypth, hypothalamus; ME, medial eminence; MM, medial mammillary nucleus; pPV, posterior part of the periventricular nucleus; pVZ, periventricular zone; VMH, ventromedial nucleus; VZ, ventricular zone. Scale bar 150 μ m (**b, e**), 40 μ m (**a, c**), 20 μ m (**d, f, f', h**), 10 μ m (**g, i**) and 5 μ m (**j**).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the IBENS Imaging Facility (supported by grants from Région Ile-de-France DIM NeRF 2009) and to the IBENS mouse facility, in particular A. Boudjouher and C. Auger. We thank Nathalie Rouach and Annette Koulakoff (College de France, France) for the gift of the *hGFAP::GFP* line. The P.C. laboratory was financed by the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ministère de la Recherche et Technologie (MRT), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and the Association de Recherche sur le Cancer (ARC). It has received support under the program « Investissements d'Avenir » launched by the French Government and implemented by the ANR, with the references: ANR-10-LABX-54 MEMOLIFE and ANR-11-IDEX-0001-02 PSL* Research University. A.J. was supported by a doctoral grant from Sorbonne Universités and by the MEMOLIFE program. A.G. was supported by the Fondation Pierre Gilles de Gennes, FRM (SPF20101221087), MRT and the MEMOLIFE program.

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- Allen E (1912) The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *Journal of Comparative Neurology* 22:547–568.
- Alonso M, Ortega-Pérez I, Grubb MS, Bourgeois J-P, Charneau P, Lledo P-M (2008) Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *Journal of Neuroscience* 28:11089–11102.
- Altman J, Das GD (1965a) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- Altman J, Das GD (1965b) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953–956.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, Liu KJ, Baker CVH (2010) Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21040–21045.
- Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G (2008) The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes. *Journal of Neuroscience* 28:3966–3975.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J, Bayam E, Lepier A, Stempfhuber B, Kirchhoff F, Hirrlinger J, Haslinger A, Lie DC, Beckers J, Yoder B, Irmeler M, Götz M (2010) In Vivo Fate Mapping and Expression Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Prospectively Isolated Adult Neural Stem Cells. *Stem Cell* 7:744–758.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascón S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524–1533.
- Brunne B, Zhao S, Derouiche A, Herz J, May P, Frotscher M, Bock HH (2010) Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia* 58:1553–1569.
- Coulpier F, Le Crom S, Maro GS, Manent J, Giovannini M, Maciorowski Z, Fischer A, Gessler M, Charnay P, Topilko P (2009) Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers. *Glia* 57:1450–1457.
- Deshpande A, Bergami M, Ghanem A, Conzelmann K-K, Lepier A, Götz M, Berninger B (2013) Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E1152–E1161.

- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2014) Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156:1072–1083.
- Esposito MS (2005) Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *Journal of Neuroscience* 25:10074–10086.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S (2011) Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to Give Rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons, and Olfactory Ensheathing Cells. *Journal of Neuroscience* 31:6915–6927.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 23:9357–9366.
- Gage FH, Temple S (2013) Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain. *Neuron* 80:588–601.
- Gal A, Rau I, Matri El L, Kreienkamp H-J, Fehr S, Baklouti K, Chouchane I, Li Y, Rehbein M, Fuchs J, Fledelius HC, Vilhelmsen K, Schorderet DF, Munier FL, Ostergaard E, Thompson DA, Rosenberg T (2011) Autosomal-Recessive Posterior Microphthalmos Is Caused by Mutations in PRSS56, a Gene Encoding a Trypsin-Like Serine Protease. *The American Journal of Human Genetics* 88:382–390.
- Ge S, Yang C-H, Hsu K-S, Ming G-L, Song H (2007) A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron* 54:559–566.
- Gould E (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience* 8:481–488.
- Haan N, Goodman T, Najdi-Samiei A, Stratford CM, Rice R, Agha El E, Bellusci S, Hajihosseini MK (2013) Fgf10-Expressing Tanycytes Add New Neurons to the Appetite/Energy-Balance Regulating Centers of the Postnatal and Adult Hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 33:6170–6180.
- Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, Hevner RF (2012) Tbr2 Is Essential for Hippocampal Lineage Progression from Neural Stem Cells to Intermediate Progenitors and Neurons. *Journal of Neuroscience* 32:6275–6287.
- Ihrle RA, Álvarez-Buylla A (2011) Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron* 70:674–686.
- Ihrle RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, Kriegstein AR, Álvarez-Buylla A (2011) Persistent Sonic Hedgehog Signaling in Adult Brain Determines Neural Stem Cell Positional Identity. *Neuron* 71:250–262.
- Iwano T, Masuda A, Kiyonari H, Enomoto H, Matsuzaki F (2012) Prox1 postmitotically

defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development* 139:3051–3062.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences* 27:447–452.

Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JLR, Alvarez-Buylla A (2007) A Subpopulation of Olfactory Bulb GABAergic Interneurons Is Derived from Emx1- and Dlx5/6-Expressing Progenitors. *Journal of Neuroscience* 27:6878–6891.

Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679–683.

Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15:700–702.

Lee DA, Blackshaw S (2012) Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*:1–7.

Lepousez G, Nissant A, Bryant AK, Gheusi G, Greer CA, Lledo PM (2014) Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:13984–13989.

Li G, Fang L, Fernández G, Pleasure SJ (2013) The Ventral Hippocampus Is the Embryonic Origin for Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus. *Neuron*:1–15.

Li G, Kataoka H, Coughlin SR, Pleasure SJ (2009) Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development* 136:327–335.

Li J, Tang Y, Cai D (2012) IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nature Cell Biology* 14:999–1012.

Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *Journal of Neuroscience* 22:6639–6649.

Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *NSC* 166:241–251.

Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian

brain. *Science* 264:1145–1148.

- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133–140.
- Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF (2012) Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* 335:1238–1242.
- Markakis EA (2004) Novel Neuronal Phenotypes from Neural Progenitor Cells. *Journal of Neuroscience* 24:2886–2897.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sanders TA, Magno L, Kessaris N, Álvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 17:207–214.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic Organization of Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Science* 317:381–384.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo J-M, Álvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17528–17532.
- Ming G-L, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702.
- Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H, Álvarez-Buylla A (2010) The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *J Vis Exp*.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo J-M, Álvarez-Buylla A (2008) Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3:265–278.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L (2007) A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *genesis* 45:593–605.
- Nair KS, Hmani-Aifa M, Ali Z, Kearney AL, Salem SB, Macalinao DG, Cosma IM, Bouassida W, Hakim B, Benzina Z, Soto I, Söderkvist P, Howell GR, Smith RS, Ayadi H, John SWM (2011) Alteration of the serine protease PRSS56 causes angle-closure glaucoma in mice and posterior microphthalmia in humans and mice. *Nat Genet* 43:579–584.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33:72–86.

- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9:439–447.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474–486.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 21:6706–6717.
- Pierce AA, Xu AW (2010) De Novo Neurogenesis in Adult Hypothalamus as a Compensatory Mechanism to Regulate Energy Balance. *Journal of Neuroscience* 30:723–730.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565–4574.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11:1392–1401.
- Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, Ninkovic J, Briancon N, Maratos-Flier E, Flier JS, Kokoeva MV, Placzek M (2013) α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* 4:2049.
- Rodríguez EM, Blázquez JL, Pastor FE, Peláez B, Peña P, Peruzzo B, Amat P (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89–164.
- Seki T, Sato T, Toda K, Osumi N, Imura T, Shioda S (2013) Distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J Comp Neurol* 522:261–283.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience* 21:7153–7160.
- Sousa-Ferreira L, de Almeida LP, Cavadas C (2014) Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25:80–88.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo J-M, Álvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells

during embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 25:10–18.

Stenman J, Toresson H, Campbell K (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 23:167–174.

Tramontin AD, Garcia-Verdugo J-M, Lim DA, Álvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580–587.

Urbán N, Guillemot F (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8:396.

Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental Neurology* 192:251–264.

Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD (2007) Subventricular Zone Stem Cells Are Heterogeneous with Respect to Their Embryonic Origins and Neurogenic Fates in the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 27:8286–8296.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132:645–660.

- PARTIE 2 -

Données additionnelles

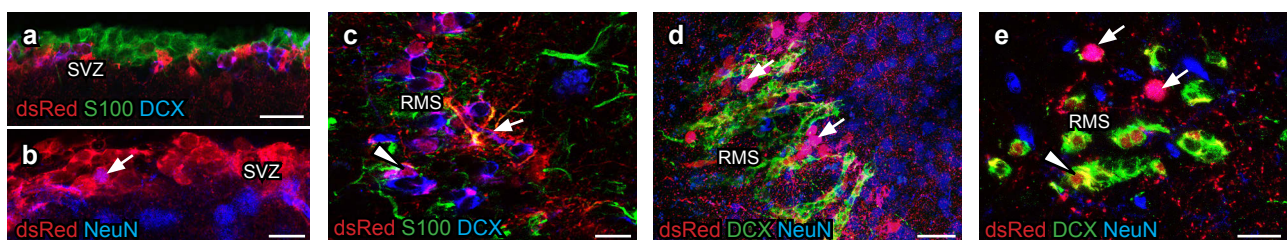
***Prss56*^{Cre}-traced cells include adult-born neuronal cells in the RMS, SVZ and striatum**

It is believed that newborn cells generated by the adult subventricular zone (SVZ) are specified to differentiate exclusively into interneurons in the OB after a long journey through the rostral migratory stream (RMS) or into oligodendrocytes in the nearby *corpus callosum* (Ortega et al., 2013). Although strong evidences indicate that OB neurogenesis decreases over time the reason of this phenomenon is still unclear (Conover and Shook, 2011; Capilla-Gonzalez et al., 2013). B1 cells number declines in the SVZ and it was suggested that they differentiate into ependymal cells and/or postmitotic/quiescent astrocytes (Luo et al., 2008). Surprisingly, the remaining B1 cells compensate this lost by proliferating more actively. Other alterations might therefore occur downstream of B1 cells during aging (Stoll et al., 2011; Shook et al., 2012).

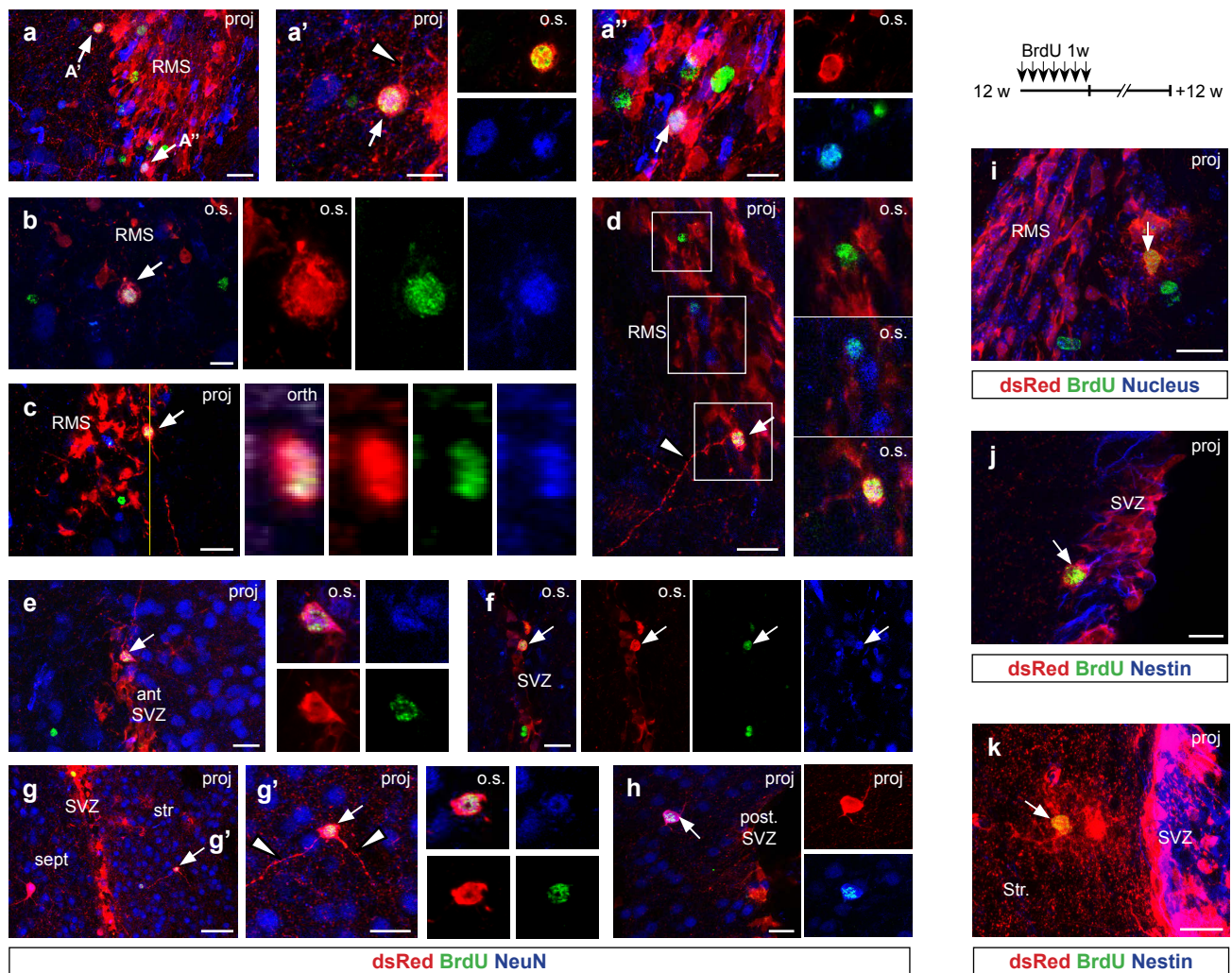
To assess the fate of *Prss56*-lineage traced B1 cells during ageing, identity of traced cells in 19 months old *Prss56*^{Cre/+}, *Rosa26*^{tdTom/+} SVZ, RMS and OB were investigated. At this stage, ependymal cells do not seemed to be traced (additional data Fig. **1a**). On the contrary, traced S100-positive astrocytes are observed in the SVZ and RMS (additional data Fig. **1b** and data not shown). In coronal sections through the RMS, 29.9±6.9% (n=3) of the DCX-positive cells are traced suggesting traced B1 cells remain neurogenic until this stage. Surprisingly, numerous traced NeuN-positive cells that do not present DCX-immunoreactivity are observed in the SVZ and RMS (additional data Fig. **1b, d, e**).

To investigate if those traced NeuN-positive cells were generated during adulthood, we performed BrdU injections in 3 month-old mice and investigated the identity of BrdU-labeled cells 3 months later. Numerous BrdU-labeled traced cells presenting a NeuN-immunoreactivity (BrdU+NeuN+ traced cells) were identified at different levels of the RMS (additional data Fig. **2a-d**). More surprisingly, similar cells were also observed in the SVZ (additional data Fig. **2e-f**) and nearby striatum (additional data Fig. **2g-h**). These triple-labeled cells extend neurites (additional data Fig. **2a', d, g**) suggesting they are more differentiated than neuroblast. Finally few traced BrdU-labeled cells showing a glial “bushy shape” are found in the RMS, SVZ and striatum (additional data Fig. **2i, j, k**).

Together these observations suggest that NeuN-positive neuronal cells and glial cells are generated in the SVZ, RMS and striatum during adulthood in the mouse.



Additional data - Figure 1 Fate mapping of *Prss56*-expressing cells in the SVZ and RMS of 19 months old *Prss56^{Cre/+} Rosa26^{tdTom/+}* mice. **a** Optical slice of a confocal stack showing the presence of DCX-positive traced cells in the SVZ and the absence of traced cells in the S100-positive ependymal layer. **b** Confocal image revealing the presence of a NeuN-positive traced cells in the SVZ (arrow). **c-e** Confocal section through the RMS showing the presence of numerous DCX-positive cells (**c**, **d** arrowheads), a S100-positive traced cells (**c**, arrow) and several NeuN-positive DCX-negative traced cells (**d**, **e** arrows). Scale bar 30 μ m (**a**, **d**) and 15 μ m (**b**, **c**, **e**).



Additional data - Figure 2 Presence of BrdU+NeuN+ traced cells in the RMS, SVZ and striatum of *Prss56*^{Cre/+} *Rosa26*^{tdTom/+} mice 3 months after BrdU injection. BrdU injection procedure is indicated on the top-right part. **a-d** Confocal images through the RMS showing six examples of BrdU+NeuN+ traced cells (**a-d**, arrows) and example of a non-traced BrdU+NeuN+ cell (**d**, middle square) and a BrdU+ cell without any other immunoreactivity (**d**, top square). **e-h** Coronal confocal images at the level the lateral ventricle showing two BrdU+NeuN+ traced cells inside the SVZ (**e**, **f**, arrow) and two in the striatal parenchyme (**g-h**, arrows). Note the presence of traced dendritic-like extensions in the parenchyme (**a'**, **d**, **g'** arrowhead). **i-k**, Confocal stacks showing BrdU+ traced cells with a glial morphology in the RMS and periventricular striatum (**i**, **k** arrow, respectively) and a BrdU+Nestin+ traced cell in the SVZ (**j**, arrow). RMS, rostral migratory stream ; ant- post- SVZ, anterior and posterior subventricular zone ; str, striatum ; sept, septum. Confocal images views : proj, z-stack projection ; o.s., z- optical slice ; orth, orthogonal view (xz). *Scale bar* 20 μm except 50 μm (**g**), 10 μm (**a'**, **a''**, **b**).

DISCUSSION

Le travail de thèse présenté dans cet ouvrage décrit le profil d'expression et de traçage du gène *Prss56* dans le système nerveux central (SNC) de souris. L'utilisation de la lignée de souris *knock-in Prss56^{Cre}*, en combinaison avec deux lignées rapportrices inductibles par la Cre, m'a permis de découvrir que ce gène, dont la fonction est inconnue, est exprimé par des cellules souches/progénitrices neurales de trois niches neurogéniques du SNC : la SVZ, la SGZ et la zone ventriculaire de l'hypothalamus. Contrairement aux défauts de développement qu'elle provoque au niveau de l'œil (Nair et al., 2011), l'inactivation du gène *Prss56* n'a pas d'effet perceptible sur la neurogenèse adulte dans ces trois zones et les souris *Prss56^{Cre/Cre}* sont viables, fertiles et dénuées de trouble du comportement. Par conséquent, la suite de mon étude s'est focalisée sur la caractérisation cellulaire et moléculaire des cellules souches exprimant *Prss56* et de leurs dérivés. Cette étude m'a permis :

- de décrire en détail le lignage cellulaire impliqué dans le développement du GD ;
- d'évaluer la participation d'une population régionalisée de cellule B1 dans la génération des divers interneurons du BO après la naissance ;
- d'identifier un nouvel élément cellulaire potentiellement impliqué dans la neurogenèse de l'hypothalamus ;
- et plus généralement de démontrer l'utilité de la lignée *Prss56^{Cre}* pour l'étude de ces niches neurogéniques.

La première partie de cette discussion évalue la nature du lien entre *Prss56* et les niches neurogéniques. J'analyse ensuite plus en détail certains des éléments intéressants qui ressortent des résultats de l'article, des données additionnelles et de mes observations. Les deux dernières parties sont dédiées à la discussion des avantages et inconvénients liés à l'utilisation des approches de traçage génétique et à l'intérêt qu'offre notre modèle pour étudier divers aspects de la neurogenèse adulte.

1 *Prss56*, *Prss56*^{Cre} et les niches neurogéniques adultes

1.1 Le gène *Prss56* n'est-il exprimé que par des cellules souches ?

Le patron d'expression spatiotemporel du gène *Prss56* est surprenant. Il est limité à trois sous-populations régionalisées de cellules neurogéniques du SNC et à une sous-population de cellules engainantes du système olfactif (OEC) (Figure 22). Mis à part ces quatre sites présentés dans l'article, nous avons également détecté l'ARNm du gène après la naissance au niveau du striatum latéral et de quelques cellules de la partie médio-postérieure du septum (données non présentées). En cohérence avec une étude comparant le transcriptome des astrocytes, neurones et oligodendrocytes du cerveau (Cahoy et al., 2008), le gène *Prss56* semble être exprimé par des cellules de type astroglial : OEC, cellule B1 de la SVZ, glie radiaire du GD, tanycyte et astrocytes (cf. Article et données non présentées). Alors que l'expression spécifique du gène par les OEC et les tanycytes semble évidente au regard de nos données, l'identité des cellules qui expriment *Prss56* dans le GD et la SVZ est plus difficile à établir.

Dans le GD, les premières cellules tracées avec la lignée *Prss56*^{Cre} apparaissent vers E13.5 et correspondent à des glies radiaires du pallium médial (cf. Article – Fig. 2). Malgré la présence de ces cellules tracées, nous n'avons pas réussi à détecter la présence de l'ARN messager de *Prss56* dans le pallium médial, ni durant l'embryogenèse, ni chez l'adulte. Il est probable que le gène soit exprimé par très peu de cellules, à un niveau trop faible ou de façon trop éphémère pour être détecté par hybridation *in situ*. Ainsi, bien que nous puissions supposer que le gène n'est exprimé que ponctuellement vers E13,5 nous ne pouvons exclure que son expression s'étende aux progéniteurs et différentes cellules souches tracés dans le GD postnatal et adulte. Cette possibilité limite partiellement les informations qu'apportent mes observations dans cette structure (voir ci-après).

Dans la SVZ, l'analyse moléculaire et la localisation des cellules tracées suggèrent que *Prss56* est exprimé dans des cellules B1 et n'est pas exprimé par les neuroblastes de la SVZ et de la RMS, ni par les interneurones du BO (cf. Article Fig. 1, 3 et Supplemental Fig. 3). Toutefois mes résultats n'excluent pas que l'expression de *Prss56* persiste transitoirement dans certains progéniteurs intermédiaires (cellule de type C), ou n'ait lieu dans d'autres cellules non-neurogéniques de la SVZ (Figure 23).

Pour déterminer précisément quelles cellules expriment *Prss56* nous avons tenté différentes approches complémentaires, malheureusement infructueuses. D'une part, nous

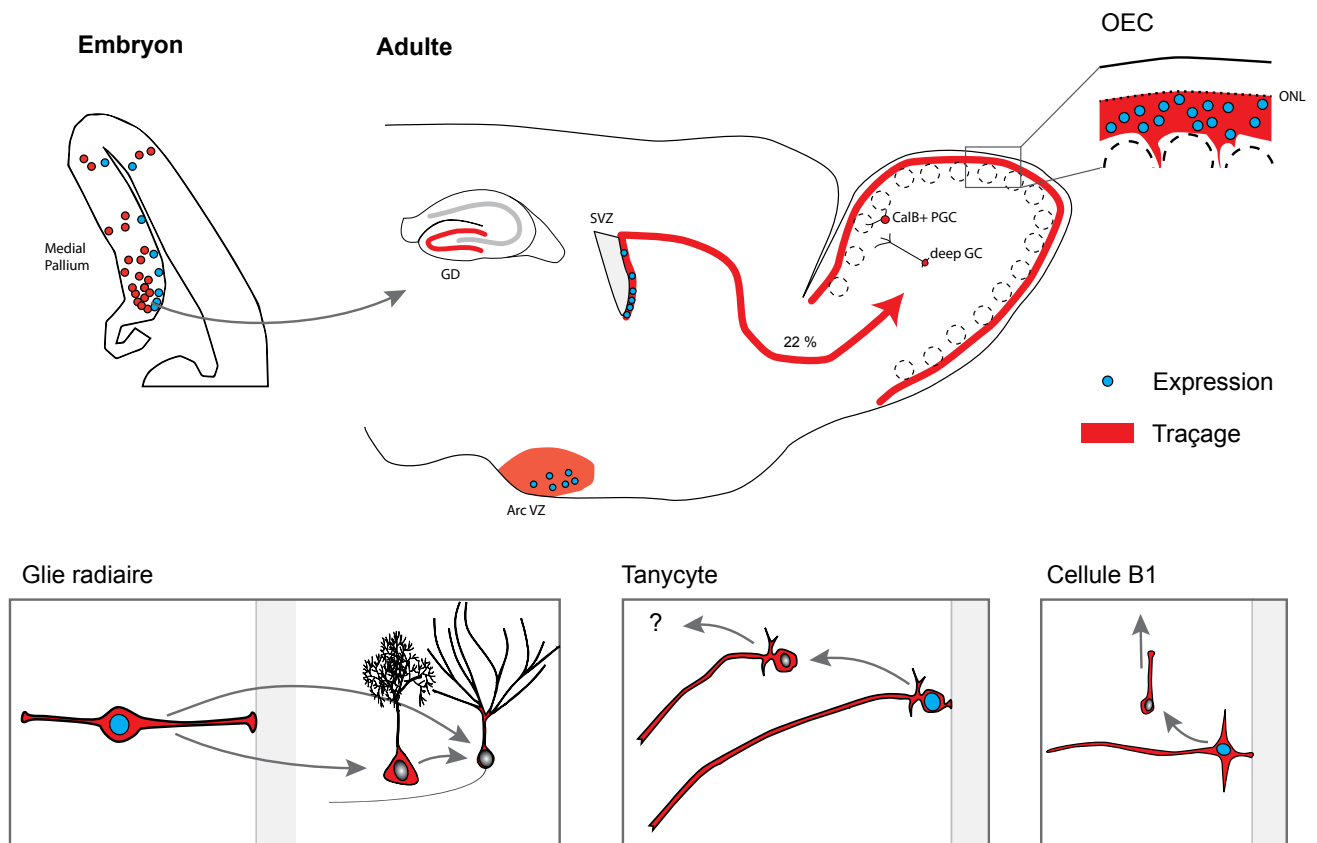


Figure 22 Schéma récapitulatif du patron d'expression et de traçage du gène *Prss56* dans le cerveau murin.

Les cellules qui expriment, avec certitude, le gène *Prss56* (en bleu) et leurs dérivés tracés au moyen de la lignée *Prss56^{Cre}* (en rouge) sont représentés. Notez que les cellules *Prss56+* des trois niches neurogéniques partagent une morphologie radiale, une interaction avec le système ventriculaire et une régionalisation particulière. GD, gyrus dentelé ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; Arc VZ, zone ventriculaire du noyau arqué de l'hypothalamus ; OEC, cellules engainantes du système olfactif ; ONL, couche des nerfs olfactifs du bulbe olfactif ; CalB+ PGC, cellule périglomérulaire Calbindin-positive ; deep GC, cellule granulaire profonde.

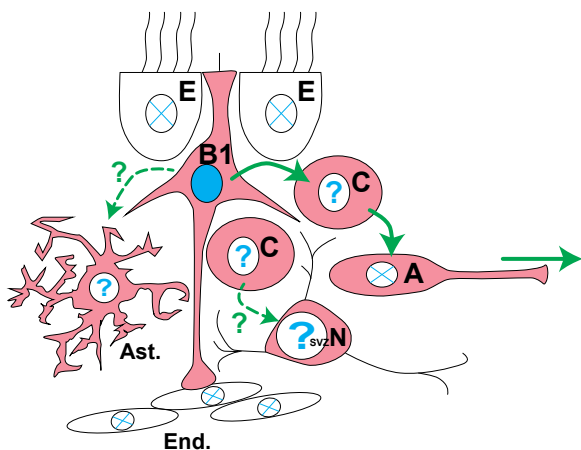


Figure 23 Quelles cellules de la SVZ expriment *Prss56* ?

Schéma représentant les types cellulaires de la SVZ avec en rouge les cellules tracées avec la lignée *Prss56^{Cre}*, en vert les différenciations cellulaires connues (trait plein) ou envisagées (pointillé) et en bleu les informations sur l'expression du gène qui en découlent : certaine (noyau bleu), éventuelle (?) ou absente (X). A, neuroblaste ; Ast., astrocytes de la SVZ (parfois appelé B2) ; B1, cellules souches de type B1 ; C, progéniteur à prolifération transitoire ; E, cellule épendymaire ; End., cellule endothéliale ; N, neurone de la SVZ.

avons développé un anticorps polyclonal dirigé contre les peptides correspondant à la partie extracellulaire de la protéine Prss56. Cet anticorps s'est avéré efficace pour détecter la protéine par western blot mais n'a donné aucun signal spécifique par immunohistochimie sur coupes. D'autre part, nous avons généré une lignée de souris transgénique contenant la cassette *tdTom-IRES-CreERT2* sous contrôle des éléments de régulation de *Prss56*. Cette construction devait permettre à la fois d'étudier l'expression de *Prss56* grâce à l'expression du marqueur fluorescent TdTom et de disposer du système de recombinaison inductible par Tamoxifène de la CreERT2. Le sort s'acharnant contre nous, nous n'avons obtenu qu'un seul fondateur contenant l'intégralité de la construction sans pour autant être capable de valider la fonctionnalité de la construction. Pour résoudre ce problème, le laboratoire compte désormais insérer cette même construction en *knock-in* au niveau du locus de *Prss56*. Cette nouvelle lignée (*Prss56^{tdTom-CreERT2}*) devrait permettre de répondre à plusieurs des questions que mes observations avec *Prss56^{Cre}* laissent en suspens.

1.2 Quelle est la particularité des cellules qui expriment *Prss56* ?

Les populations de cellules qui expriment *Prss56* dans le GD, la SVZ et l'hypothalamus présentent plusieurs similarités (Figure 22). Elles ont chacune une morphologie radiale, sont polarisées et contactent le système ventriculaire (les cellules souches du GD perdent ce contact durant l'embryogenèse). Ces cellules semblent activer le locus *Prss56* à un moment clé de la mise en place de leurs niches respectives : E13,5 pour le GD et entre P0 et P14 pour l'hypothalamus et la SVZ (cf. Article – Fig. 2, 3, 5). Malgré cette activation précoce, les cellules souches tracées avec *Prss56^{Cre}* ne représentent qu'une proportion minoritaire des cellules souches présentes. Il est possible que la recombinaison par la Cre ne soit pas complètement efficace et que le traçage ne représente pas fidèlement le nombre de cellules exprimant *Prss56*. D'autre part, notre analyse montre que l'expression de *Prss56* est régionalisée dans chacune des niches, ce qui suggère que ce gène est exprimé par des sous-populations bien définies de cellules souches. Cependant, cette régionalisation ne semble pas être le reflet d'un potentiel de différenciation restreint, puisque les cellules tracées sont à chaque fois capables de générer une diversité de dérivés neuronaux et gliaux, indiquant que *Prss56* est induit dans des populations pluripotentes *in vivo*.

Ces éléments de similarité m'ont poussé à supposer que la régulation et la fonction de *Prss56* pourraient être identiques dans ces trois populations. Comprendre les facteurs qui agissent sur la régulation de *Prss56* pourrait permettre de mieux comprendre comment les différentes niches sont régionalisées et si les mécanismes régissant cette régionalisation sont,

comme l'expression de *Prss56*, communs aux trois niches. La régulation de ce gène étant inconnue et l'analyse bioinformatique des séquences en amont du locus ne m'ayant pas permis d'identifier de séquences régulatrices potentielles (données non présentées), je me suis intéressé aux morphogènes et facteurs de transcription susceptibles d'expliquer la régionalisation du gène dans chacune des niches.

1.3 Quels facteurs sont susceptibles d'intervenir dans la régulation du gène *Prss56* ?

Au niveau du GD, l'induction du gène dans la partie ventrale du pallium médial (cf. Article – Fig. 2c), suggère que son expression pourrait être contrôlé par les morphogènes Wnt ou BMP sécrétés par le *cortical hem* (Figure 9) et par des facteurs de transcription exprimés dans cette zone du pallium, comme *Lef1*, *Lhx2* ou *Emx2* (Rolando and Taylor, 2014). Au niveau de la SVZ postnatale, l'expression de *Prss56* dans la région médiane - ventrale du mur ventriculaire latéral suggère, au contraire, une implication du morphogène SHH qui est sécrété depuis la zone ventrale du mur (cf. Article – Fig. 3). Ce morphogène est d'ailleurs impliqué dans la production des cellules périglomérulaires CalB-positives et des cellules granulaires profondes, que nous retrouvons tracées en grande proportion avec notre système (cf. Article - Fig. 4) (Ihrie et al., 2011). D'autre part, des facteurs de transcription comme *Gsh2*, *Gli1* ou *Gsx1* sont exprimés dans la même région que *Prss56* et seraient susceptibles d'intervenir dans sa régulation (Stenman et al., 2003; Young et al., 2007; Lopez-Juarez et al., 2013).

Les morphogènes et facteurs de transcription qui régionalisent la zone ventriculaire du 3^{ème} ventricule après la naissance sont moins bien caractérisés. La voie Wnt semble cependant impliquée dans la différenciation des progéniteurs de cette zone après la naissance (Wang et al., 2012). Il est intéressant de noter que la signalisation Wnt/ β -catenin est également activée spécifiquement dans les OEC tracées du BO durant le développement (Zaghetto et al., 2007; Booker-Dwyer et al., 2008; Wang et al., 2008). Enfin, il semble y avoir une certaine coïncidence entre l'activation des locus *Prss56* et *GFAP* dans les cellules que nous traçons dans la SVZ et le GD: l'induction de *Prss56* semble précéder celle de *GFAP*. Cependant, dans l'hypothalamus et les OEC ces deux gènes sont exprimés par deux populations bien séparées.

Ces différents sites d'expression de *Prss56* présentent donc un « contexte transcriptionnel » différent, ce qui indiquerait que la régulation de ce gène passe par des mécanismes spécifiques à chaque site. La SVZ constitue peut-être le site le plus accessible pour étudier la régulation du gène. Pour tester l'implication de SHH dans la régulation de *Prss56*, il serait intéressant d'analyser l'expression de *Prss56* chez des animaux présentant

une inactivation conditionnelle de SHH dans la zone ventrale ou au contraire une activation ectopique de la voie SHH dans les cellules souches dorsales de cette niche.

1.4 Une fonction pour la protéine Prss56 ?

Mis à part son implication dans certaines pathologies du développement de l'œil, nous n'avons que peu d'informations sur la fonction de la protéine Prss56. L'inactivation du gène *Prss56* chez les souris *Prss56^{Cre/Cre}* ne conduit à aucun phénotype évident au niveau du SNC. D'après les analyses bioinformatiques réalisées par une autre équipe, la protéine serait une sérine protéase membranaire ou sécrétée (Nair et al., 2011). Nous pourrions spéculer que cette protéase joue un rôle au niveau du liquide cérébro-spinal (Figure 22). Son activité protéase à la membrane permettrait d'y moduler certaines signalisations. Des protéases sont par exemple impliquées dans l'établissement des gradients d'activité de certains morphogènes (mécanisme de *morphogen shuttling* (Shilo et al., 2013)), un rôle qui permettrait d'expliquer la présence régionalisée de la protéase Prss56 dans des zones exposées systématiquement à des morphogènes (Wnt ou SHH).

2 Evolutions de la neurogenèse et de la gliogenèse durant la formation du GD et l'établissement de la SGZ

Le développement du GD est très complexe et, malgré des avancées considérables, plusieurs aspects restent mal compris. Certaines études suggèrent que la neurogenèse du GD est initiée depuis différents sites embryonnaires au cours du temps : la zone ventriculaire, la jonction fimbria-gyrus, le hile ou encore la zone subpiaie (Figure 10). Cette multitude de matrices neurogéniques suggère une régionalisation complexe de la neurogenèse embryonnaire (Li et al., 2009; Hodge et al., 2013; Urbán and Guillemot, 2014).

Le suivi du devenir des glies radiaires – tracées très précocement durant le développement de la structure par notre système – permet pour la première fois d'étudier de façon spécifique les populations cellulaires impliquées dans la neurogenèse continue des neurones granulaires du GD. Cette analyse révèle que la distribution des cellules progénitrices tracées (cellules Sox2⁺ et Tbr2⁺) est plus homogène que ne laisserait supposer les études précédemment publiées (cf. Article - Fig. 2). D'autre part, ces cellules tracées Sox2⁺ et Tbr2⁺ ne présentent pas de différences de localisation, ni de différences de morphologie évidentes avant P14. A ce stade l'expression de *Tbr2* disparaît de la couche moléculaire et les cellules exprimant Sox2 adoptent des caractéristiques d'astrocytes protoplasmiques (cf. Article - Fig. 2). Cette observation suggère qu'entre P7 et P14 la couche moléculaire perd sa capacité à

maintenir des précurseurs neurogéniques et que ceux-ci se différencient en astrocytes, hypothèse en accord avec plusieurs données de la littérature (Brunner et al., 2013).

Ces différentes observations, couplées à plusieurs données de la littérature, me permettent de proposer un modèle de neurogenèse du GD basée sur la présence d'une **unique matrice** de progéniteurs, couvrant la totalité de la structure (Figure 24). Cette unique zone progénitrice du GD – où se mélangent cellules souches radiales et progéniteurs intermédiaires – est à opposer aux différentes couches de la neurogenèse corticale, clairement stratifiée en VZ, SVZ et couches neuronales. Cette hypothèse est de plus en cohérence avec le fait que tous les progéniteurs du GD, quel que soit leur position, ne génèrent qu'un seul type neuronal : le neurone granulaire immature (Prox1+). Ces neurones sont les seules cellules à subir une régionalisation évidente puisqu'il forme très précocement une couche granulaire visible durant le développement (Figure 24). Cette régionalisation des neurones immatures dépend de l'interaction entre l'échafaudage glial et les cellules de Cajal Retzius situées dans la zone marginale du GD, notamment via la sécrétion de Reelin par ces dernières (Sibbe et al., 2009). L'inactivation de cette sécrétion chez le mutant *Reeler* entraîne une dispersion postnatale des cellules Prox1+ (Brunner et al., 2013).

Nous pouvons spéculer qu'après la naissance les signaux permettant le maintien des progéniteurs disparaissent des différentes zones du GD, ce qui provoquerait leur différenciation terminale en cellules gliales non-neurogéniques (astrocytes du hile et de la couche moléculaire et oligodendrocyte dans la *fimbria*). Seule la SGZ conserverait l'environnement nécessaire au maintien de certaines cellules souches, ce qui provoque l'établissement de cellules de type I entre P7 et P14 (Figure 24) (cf. Article – Supplemental Fig. 2). Ce phénomène impliquerait l'entrée des cellules souches dans un état de quiescence et l'activation d'un processus neurogénique spécifique à l'âge adulte (Urbán and Guillemot, 2014). Au vu de ce modèle, il serait important de déterminer quels événements moléculaires ou cellulaires provoquent la diminution contrôlée de la matrice neurogénique du DG après P7.

Chez l'adulte, les populations cellulaires tracées avec *Prss56^{Cre}* sont de quatre types : cellules granulaires, cellules souche de type I, astrocytes et oligodendrocytes (cf. Article – Supplemental Fig. 2). Cette diversité suggère que les glies radiales tracées constituent une population pluripotente et sont notamment capables de générer des cellules souches de type I chez l'adulte. La distribution des cellules tracées révèle une régionalisation dorso-ventrale dépendante du type cellulaire (cf. Article - Supplemental Fig. 2) : les neurones granulaires et les cellules souches de type I sont présents essentiellement dans la partie dorsale du GD, alors

Figure 24 Développement du GD à partir d'une matrice neurogénique unique.

Mes résultats, couplés à ceux de plusieurs publications, suggèrent que, contrairement aux autres structures corticales, le gyrus dentelé (GD) se forme à partir d'une zone progénitrice continue (rose) qui s'étend de sa zone ventriculaire (VZ) à sa zone marginale.

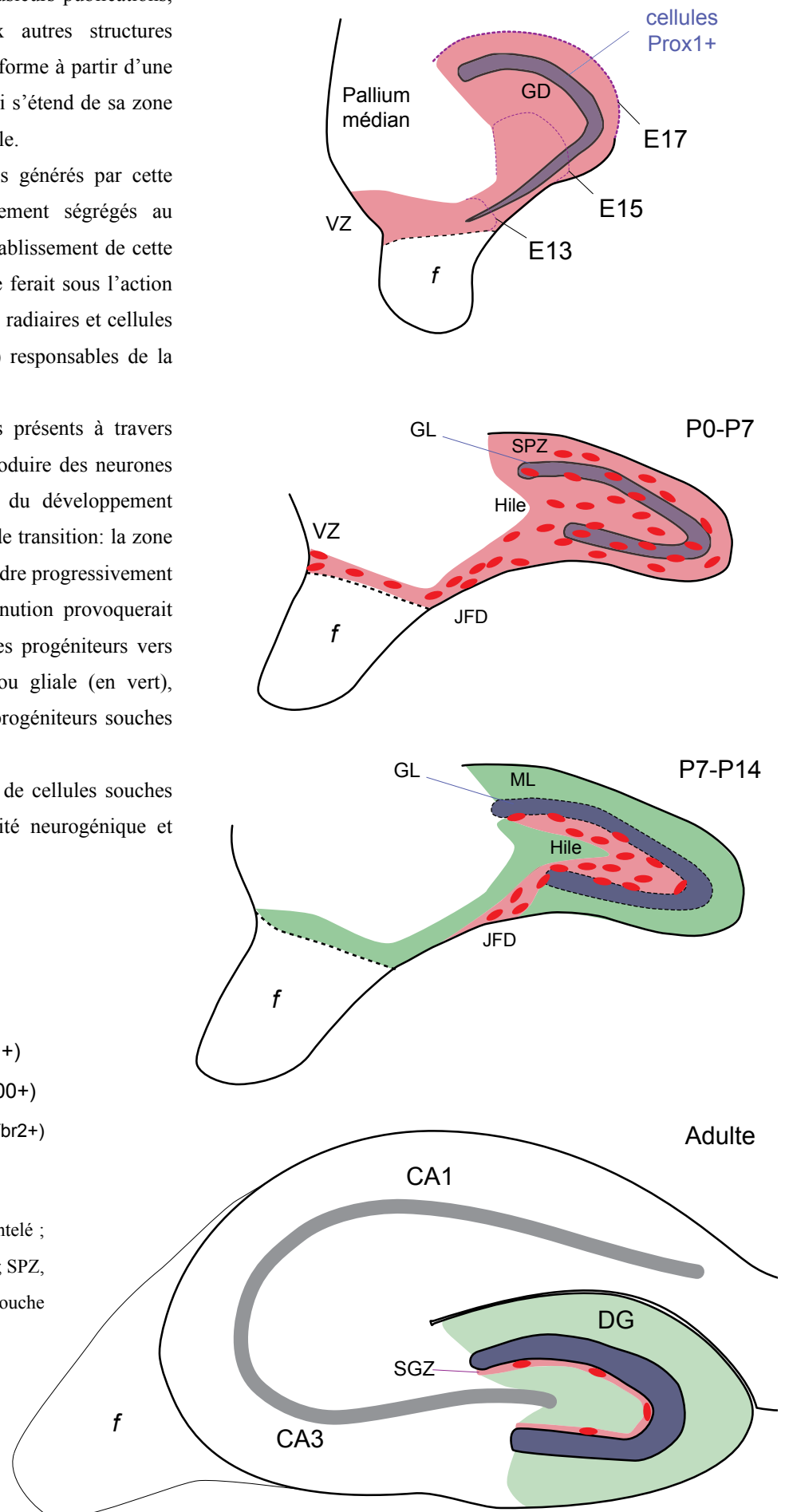
Les neurones granulaires immatures générés par cette zone progénitrice sont progressivement ségrégés au niveau de la couche granulaire. L'établissement de cette zone neuronale (Prox1+, en bleu) se ferait sous l'action de signalisations provenant des glies radiaires et cellules de Cajal Retzius (non représentées) responsables de la morphogenèse du GD.

Après la naissance, les précurseurs présents à travers l'ensemble du GD continuent de produire des neurones granulaires. La deuxième semaine du développement postnatal correspond à une période de transition: la zone progénitrice diminue pour se restreindre progressivement au hile puis à la SGZ. Cette diminution provoquerait une différenciation postmitotique des progéniteurs vers une destinée neuronale (en bleu) ou gliale (en vert), ainsi qu'une migration de certains progéniteurs souches (quiescents ?) vers la SGZ.

A l'âge adulte, un nombre restreint de cellules souches de la SGZ maintiennent une activité neurogénique et gliogénique.

- Zone progénitrice
- Zone neuronale (Prox1+)
- Zone gliale (Sox2+ S100+)
- Progéniteurs (Sox2+ ou Tbr2+)

VZ, zone ventriculaire ; GD, gyrus dentelé ;
f, fimbria ; JFD, jonction fimbria-gyrus ; SPZ,
zone subpiale (ou marginale) ; GL, couche
granulaire ; SGZ zone sous-granulaire



que les astrocytes (hile et couche moléculaire) et les oligodendrocytes (*fimbria*) sont distribués de façon plus homogène et sont notamment présents dans la partie ventrale du GD. Cette différence de distribution suggère que les cellules souches tracées dans le GD ventral sont peu neurogéniques, ne se maintiennent pas dans la SGZ et se différencient préférentiellement en astrocytes à la fin du développement (P7 - P14). La distribution des cellules souches de type I tracées est en faveur de l'existence d'une régionalisation – et donc d'une hétérogénéité – de ces cellules. Cette régionalisation est-elle la conséquence de différences de potentiels intrinsèques aux cellules tracées ? Tient-elle au contraire d'une différence dans la capacité du GD ventral à maintenir des cellules souches ? Implique-t-elle enfin une migration vers la partie dorsale, comme cela a été suggéré (Li et al., 2013) ?

3 Que révèlent l'apparition et le devenir des cellules tracées dans la SVZ

Chez l'embryon, la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) abrite des glies radiaires qui vont produire d'une part des cellules destinées au striatum (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) et d'autre part des progéniteurs qui migrent tangentiellement pour se différencier en interneurones et oligodendrocytes du cortex et du BO (He et al., 2001; Stenman et al., 2003; Díaz-Guerra et al., 2013; Bayraktar et al., 2014). Après la naissance, les zones ventriculaire et sous-ventriculaire embryonnaires se compactent pour former la SVZ adulte. Les glies radiaires se différencient majoritairement en cellules post-mitotiques du striatum et certaines s'intègrent comme cellules souches de type B1 dans la SVZ (Tramontin et al., 2003; Merkle et al., 2004). Chez l'adulte, ces cellules B1 produisent des populations d'interneurones destinées au BO (Ming and Song, 2011; Bayraktar et al., 2014) et des oligodendrocytes destinés aux structures attenantes à la SVZ (Menn et al., 2006; Capilla-Gonzalez et al., 2013; Ortega et al., 2013; Azim et al., 2014).

Nos observations avec la lignée *Prss56^{Cre}* sont en cohérence avec cette évolution. L'apparition des premières cellules radiales tracées et la détection de l'ARNm de *Prss56* dans le mur ventriculaire autour de la première semaine après la naissance coïncident avec la période de conversion de la glie radiaire en cellule B1 : entre P7 et P14, les cellules tracées dans la zone ventriculaire présentent un long prolongement vers le striatum caractéristique de glie radiaire de cette zone (cf. Article - Fig. 3). Des cellules tracées possédant des caractéristiques de progéniteurs ou de neuroblastes sont alors présentes au sein des structures postnatales correspondant à la SVZ, la RMS ainsi qu'au niveau du striatum (cf. Article - Fig. 3 et données non présentées). Parmi les cellules tracées à distance de la zone ventriculaire

dans le striatum, certaines présentent une forme intermédiaire entre glie radiaire et astrocyte protoplasmique (données non présentées), ce qui suggère que certaines cellules de glies radiaires qui se détachent du mur se différencient en astrocyte. Etrangement, dans certaines zones, l'apparition entre E18 et P7 de ces différentes cellules plus différenciées précède l'apparition des cellules radiales (données non présentées). Chez l'adulte, les dérivés tracés dans le BO correspondent essentiellement à des interneurons générés à l'âge adulte (cf. Article – Fig. 4) et nous avons également observé des oligodendrocytes tracés au niveau du corps calleux (données non présentées). Enfin, le striatum adulte présente des astrocytes, oligodendrocytes et neurones tracés (données non présentées).

Ces différentes observations suggèrent d'une part que le gène *Prss56* est induit après la naissance dans une population **mixte** de glies radiaires qui se différencient soit en progéniteurs pluripotents ou gliaux migrant vers le striatum, soit en cellules B1 de la SVZ. D'autre part, le maintien de l'expression de *Prss56* à un niveau suffisant pour être détecté par hybridation *in situ* semble requérir que la cellule maintienne son contact avec le ventricule, notamment durant la période où la VZ et la SVZ postnatale se compactent pour former la SVZ adulte. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, il est possible que la SVZ adulte conserve la capacité de générer des cellules du striatum.

4 De nouveaux neurones s'intègrent-ils dans la RMS, la SVZ et le striatum ?

Notre système de traçage est le premier système endogène qui permet de suivre le devenir d'une population de cellules B1 de façon continue après la naissance dans le cerveau murin. L'évolution des populations tracées dans le BO, la RMS et la SVZ chez des animaux adultes (de 2 à 6 mois), puis âgés (de 12 à 19 mois), récapitule la diminution progressive de la neurogenèse sous-ventriculaire avec le temps. De façon surprenante, j'ai observé au cours de cette analyse une augmentation des neurones tracés (caractérisés par le marqueur NeuN) sur le trajet de la RMS (Données additionnelles – Fig. 1). Ces neurones matures tracés pourraient être générés par différenciation précoce de certains neuroblastes durant leur migration. Pour tester cette hypothèse, j'ai récemment caractérisé plus en détail l'identité des cellules BrdU-positives présentes dans la SVZ et la RMS trois mois après une injection massive de BrdU chez des souris adultes (Données additionnelles - Fig. 2). De nombreuses cellules tracées présentant du BrdU (et donc capable de conserver ce marqueur sur le long terme) sont immuno-positives pour le marqueur de neurone mature NeuN, et ce, à différents niveaux

antéro-postérieures de la RMS, de la SVZ et du striatum attenant. Ces cellules présentent une morphologie plus mature que les neuroblastes et étendent des prolongements ramifiés semblables à des dendrites. Cette observation surprenante est encore préliminaire et nécessite d'être répétée sur un plus grand nombre d'animaux et en utilisant d'autres marqueurs neuronaux (p. ex. DCX, HuC/D, GABA, CalR, chAT, etc.) afin de confirmer l'identité neuronale de ces cellules NeuN+.

Le renouvellement de neurones dans le striatum a été décrit chez le rat et chez l'homme en condition physiologique (Ernst et al., 2014; Dayer, 2005) et chez la souris après un accident vasculaire cérébral (Wei et al., 2011; Magnusson et al., 2014). Il ne semble pas exister d'étude rapportant la production de cellules neuronales destinées à la RMS ou à la SVZ. S'il est confirmé, quelle pourrait être la fonction d'un tel phénomène ? Des populations neuronales « locales » sont impliquées dans la régulation de la niche via la sécrétion de neurotransmetteurs (Paez-Gonzalez et al., 2014) ou de morphogènes (Ihrle et al., 2011). Il serait intrigant que la niche neurogénique génère des neurones destinés à réguler sa propre activité sur le long terme. Les neurones observés sur le trajet de la RMS pourraient par exemple participer à la régulation de la migration des neuroblastes (via le glutamate, la signalisation SHH, ou leurs inhibitions) (Young et al., 2011; Faigle and Song, 2013) et être impliqué dans l'étiollement progressif de la RMS avec le temps.

5 Les tanocytes tracés sont-ils des cellules souches neurales de l'hypothalamus ?

Bien qu'il existe plusieurs preuves récentes de la présence de cellules souches neurales et de neurogenèse adulte au niveau de l'hypothalamus, l'importance de cette niche neurogénique adulte reste sujette à débat. Dans la dernière partie de l'article, je présente le traçage d'une sous-population régionalisée de tanocytes α_2 de l'hypothalamus qui expriment le gène *Prss56* après la naissance. Mes observations suggèrent que ces tanocytes sont à l'origine d'une partie des neurones et de quelques astrocytes des noyaux arqué, dorso-médial et périventriculaire durant le développement postnatal (cf. Article – Fig. 5). Je n'ai cependant pas pu démontrer que les tanocytes tracés sont effectivement une source neurogénique chez l'adulte. Notre étude basée sur l'infusion *i.c.v.* de BrdU confirme que la prolifération cellulaire au niveau de l'hypothalamus est très faible en condition basale et qu'elle est amplifiée par l'ajout du facteur mitogène FGF (Robins et al., 2013a). Cependant, six semaines après infusion avec le FGF, et contrairement à ce qui a été publié, je n'ai pas pu observer de

neurones BrdU-positifs dans le parenchyme attenant (cf. Article – Fig. 5). Il est probable qu’avec nos conditions, la genèse de cellules neuronales BrdU-positives nécessite une plus longue période que ce qui a été rapporté (Robins et al., 2013a). Pour compléter cette analyse, nous analysons actuellement l’identité des cellules BrdU-positives présentes dans l’hypothalamus trois mois après infusion.

Le traçage de cette population de tanocyte α_2 m’a cependant permis d’identifier un nouveau type cellulaire présentant les caractéristiques moléculaires et morphologiques de tanocytes mais dont le corps cellulaire est situé à distance de la paroi ventriculaire, dans le parenchyme. A ma connaissance, ces **tanocytes** (en tant que *cellules allongées*) **du parenchyme (tanP)** n’ont jamais été décrits. Je me suis donc intéressé à l’origine de ces cellules. J’ai noté que, sous l’action du FGF infusé durant notre expérience d’i.c.v., la prolifération des tanocytes tracés conduit à une augmentation du nombre de tanP tracé (cf. Article - Fig. 5 et). De plus, certains des tanP ont incorporé du BrdU dans leur ADN, ce qui suggère que soit ces cellules proviennent d’une division de tanocytes de la paroi ventriculaire, soit elles sont elles-mêmes capables de se diviser dans le parenchyme. Enfin, nombre de ces cellules présente une morphologie intermédiaire entre tanocyte et tanP : un corps cellulaire à distance de la surface ventriculaire et un pied basal en contact avec celle-ci (cf. Article - Supplemental Fig. 5). La présence de ces cellules intermédiaires permettrait d’expliquer l’épaississement de la zone ventriculaire (d’une couche monocellulaire à une couche de trois à quatre corps cellulaires d’épaisseur) observé sous l’action du FGF ou d’autres agents mitogènes (Xu et al., 2005; Pérez-Martín et al., 2010; Robins et al., 2013a). Ces différentes observations suggèrent fortement que les tanocytes sont capables de se détacher de la paroi ventriculaire, par déplacement de leur soma, et de migrer vers le parenchyme (cf. Article – Fig. 5p).

Les tanP pourraient constituer une population progénitrice intermédiaire impliquée dans la neurogenèse de l’hypothalamus. Bien que ces cellules n’aient pas été décrites précédemment, plusieurs études présentent des observations cohérentes avec leur présence :

- (Pérez-Martín et al., 2010) décrivent la présence de tanocytes *sous-épendymaux* lorsque la zone ventriculaire est soumise à l’action du IGF-I. Ils ne notent cependant pas le décrochement de ces cellules vers la périphérie ;
- (Haan et al., 2013) suggèrent la présence de progéniteurs indifférenciés qui proviendraient de tanocytes exprimant *Fgf10* et supposent que ces cellules continueraient à se diviser à la périphérie ;

- (Niwa et al., 2015) mentionne la présence de cellules BrdU+ Vimentin+ Nestin+ dans le parenchyme de l'hypothalamus chez le rat hypertensif soumis à un exercice physique.

Certaines études suggèrent que les tanycytes génèrent des neuroblastes qui migrent le long de leurs prolongements de la même façon que les neuroblastes migrent le long des glies radiaires durant l'embryogenèse (Batailler et al., 2014; Rojczyk-Golebiewska et al., 2014). Cette hypothèse n'est pas validée par mes observations chez la souris : la morphologie multipolaire des cellules DCX+ et leur distribution ne sont pas compatibles avec une migration depuis la zone ventriculaire. Ces cellules DCX+ pourrait correspondre à un stade de différenciation neuronale plus avancé (cf. Article – Supplemental Fig. 5). Ainsi, à l'inverse de la neurogenèse de la SGZ et de la SVZ, la neurogenèse de l'hypothalamus impliquerait une migration de la cellule progénitrice (le tanycyte) avant sa différenciation locale dans le parenchyme. Cette hypothèse est intéressante puisqu'elle suggère un déroulement de la neurogenèse inattendu, qui se rapprocherait de la formation des *outer radial glial cells* durant la neurogenèse corticale (Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011).

Mon étude reste malheureusement incomplète tant que je n'ai pas établi que les TanP se différencient effectivement en cellule neuronale ou gliale. Pour aller plus loin, il me faudrait identifier un marqueur spécifique des tanP durant leur migration. Enfin, il serait intéressant d'évaluer si ce mécanisme de migration est commun aux populations de tanycytes α et β et comment ce détachement des tanycytes est contrôlé au niveau de la paroi ventriculaire.

6 Quelques mots sur les cellules engainantes du bulbe olfactif

Indépendamment des zones neurogéniques, nous montrons que le gène *Prss56* est exprimé spécifiquement par des cellules engainantes olfactives (*olfactory ensheathing cells*, OEC) établies chez l'adulte dans la partie interne de la couche gliale du BO (*inner olfactory nerve layer*, iONL). L'activation du gène *Prss56* se produit vers E13,5 dans une population d'OEC du BO et n'a pas lieu dans les populations d'OEC présentes en périphérie le long du nerf olfactif (cf. Article - Supplemental Fig. 4). Cette population exprime les marqueurs d'OEC Sox10 et BLBP et n'exprime pas la GFAP (Figure 25). Le gène *Prss56* constitue donc un marqueur spécifique d'une population d'OEC de l'iONL.

Quelles fonctions remplissent ces OEC *Prss56*+ ? L'hétérogénéité antigénique indicatrice d'une hétérogénéité des OECs au niveau de l'ONL est connue (Vincent et al., 2005).

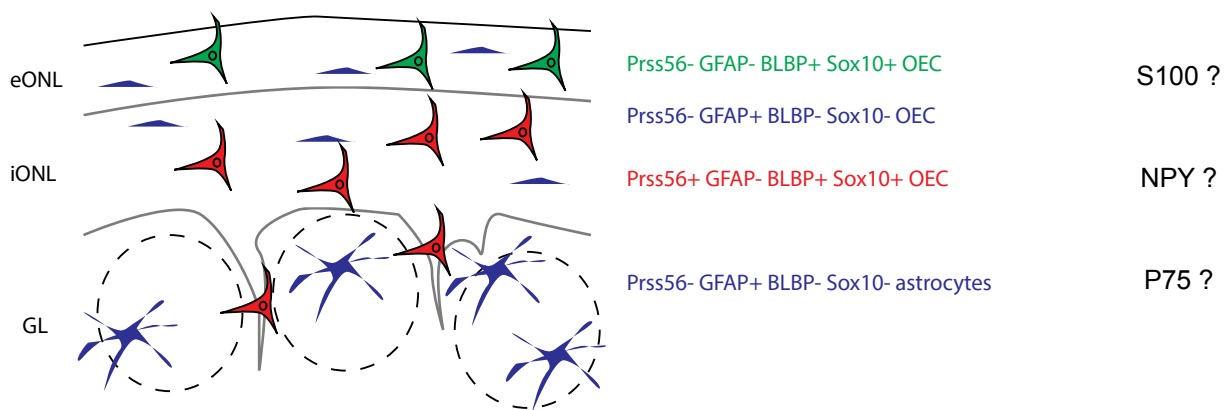


Figure 25 Profil antigénique et localisation des OECs du bulbe olfactif.

Les OECs tracées avec l'allèle *Prss56^{Cre}* (en rouge) constituent une sous-population de la partie interne de l'ONL. C'est ces cellules qui sont en interaction avec les glomérules (pointillés). Bien que cette zone contienne également des cellules gliales positives pour le marqueur GFAP (en bleu), celui-ci ne co-localise pas avec les cellules tracées. Ces données suggèrent la présence d'au moins quatre populations gliales dans la couche externe du BO. Quelques marqueurs complémentaires, connus pour être exprimés par certaines populations d'OEC, seraient à utiliser pour achever cette caractérisation. GL, *glomerular layer* ; OEC, cellules engainantes du système olfactif ; ONL, *olfactory nerve layer*.

Cependant les rôles spécifiques que remplissent chacune de ces sous-populations d'OEC du BO n'ont pas encore été clairement séparés (révisée par (Su and He, 2010)) :

- le maintien d'une perméabilité de la barrière hémato-encéphalique permettant le passage continue des axones olfactifs en condition normale et régénérative,
- la protection physique et immunitaire du système olfactif,
- la capacité d'interagir avec les astrocytes (contrairement aux cellules de Schwann),
- la capacité à migrer vers des sites de lésions du SNC et du SNP,
- le guidage et la fasciculation des axones olfactifs vers les glomérules adéquats du BO,
- une implication dans le fonctionnement des synapses du glomérule,
- un contrôle sur la neurogenèse et la formation du système olfactif durant le développement,
- un rôle attractif potentiellement exercé sur les neuroblastes de la RMS et du BO.

Notre système de traçage constitue un outil idéal pour étudier spécifiquement le rôle de cette sous-population d'OEC.

Il est intéressant de noter quelques ressemblances entre les OEC et les cellules des capsules frontières (CF) présentes transitoirement au cours du développement (cf. Annexe - Gresset et al). Ces deux populations proviennent de la crête neurale (Barraud et al., 2010), expriment *Prss56* et *Sox10*, sont capables de coopérer avec les astrocytes et participent au maintien de l'intégrité de la frontière entre le CNS et le PNS (Figure 21 et 25). Il est ainsi possible que la fonction de *Prss56* au niveau de ces deux sites d'expression soit similaire.

7 Remarques sur l'utilisation des lignées rapportrices

Mes observations montrent que l'apparence des cellules tracées dépend de la lignée rapportrice utilisée et du type cellulaire étudié (Figure 26) (cf. Article – Supplemental Fig. 1). La différence de facilité de détection des cellules de type I du GD entre la lignée *Rosa26^{mt/mG}* et la lignée *Rosa26^{tdTom}* est la plus critique. Elle se retrouve lorsque l'on compare différentes publications (p. ex. (Li et al., 2013) et (Bowman et al., 2013)). L'utilisation de la lignée *Rosa26^{tdTom}* est actuellement en pleine expansion, et pourrait entraîner de nombreuses conclusions et quantifications erronées sur les cellules souches du GD.

Les deux constructions sont pourtant élaborées sur un modèle identique : elles sont situées au locus *Rosa26* et présentent un promoteur fort identique (*enhancer* du CMV couplé au promoteur de la β -actine du poulet) en amont des sites *lox*. Comment alors expliquer cette différence de fluorescence entre les deux lignées rapportrices ? La localisation subcellulaire

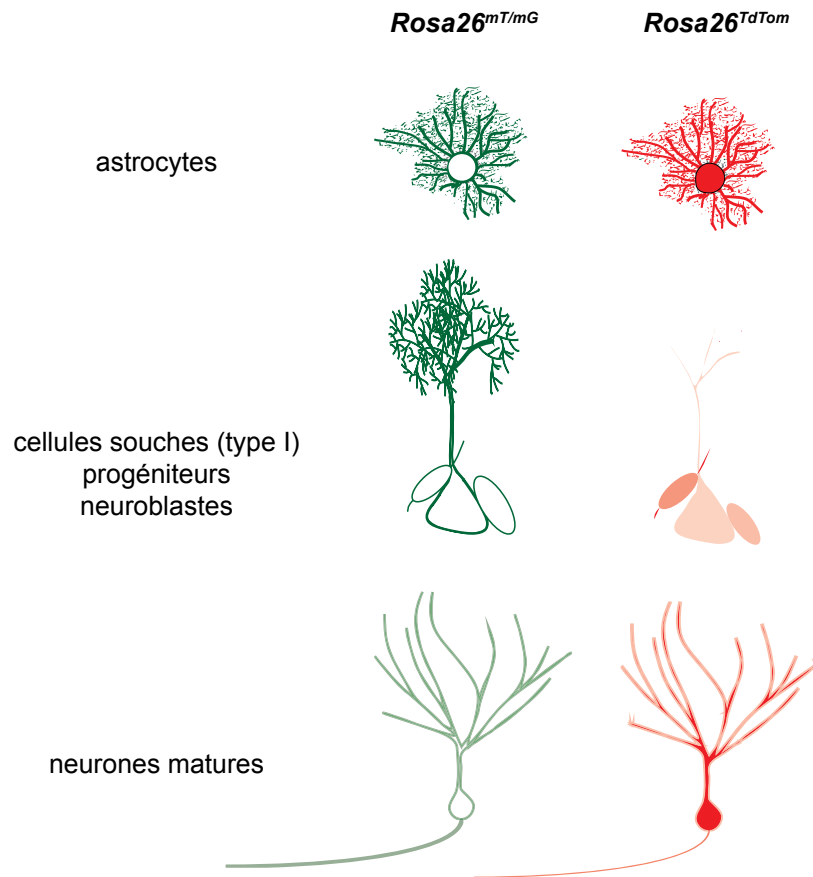


Figure 26 Différences du signal fluorescent et de l'apparence de différents types cellulaires lors de l'utilisation des lignées rapportrices *Rosa26^{mT/mG}* et *Rosa26^{tdTom}*.

Bien que ces différences soient plus flagrantes dans le gyrus dentelé (cf. Article - Supplemental Fig. 1), elles se retrouvent également dans l'ensemble du système nerveux. Notez la difficulté d'identifier plusieurs corps cellulaires agrégés avec la mGFP et la surprenante faiblesse d'intensité du signal de la tdTom dans les cellules de type I, les progéniteurs et neuroblastes. Les observations ont été réalisées après fixations en paraformaldéhyde et marquage par immunohistochimie (anticorps anti-dsRed et anti-GFP) et reflètent donc des différences de quantité et non d'intensité de fluorescence des protéines rapportrices tdTom et mGFP.

de la protéine fluorescente (membranaire ou cytoplasmique) serait importante pour la détection des cellules de type I, notamment pour distinguer leur morphologie : la localisation cytoplasmique de la tdTom l'empêcherait de diffuser efficacement, alors que l'adressage à la membrane permettrait à la mGFP de diffuser à travers l'ensemble des ramifications de la cellule de type I. Cependant cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la faible quantité de protéine tdTom détectée (Figure 25). Celle-ci suggère un faible taux de protéines tdTom circulantes dans les cellules de type I qui pourrait, par exemple, s'expliquer par une différence de vitesse de dégradation entre les protéines tdTom et mGFP.

8 *Prss56^{Cre}* : un nouvel outil d'étude de la neurogenèse adulte ?

La tendance agaçante qu'a la nature à réutiliser les mêmes gènes pour remplir différentes fonctions à différentes périodes limite habituellement l'utilisation de lignées basées uniquement sur la recombinaise Cre. Une version « améliorée » de ce système utilise une fusion de la recombinaise Cre avec le récepteur aux œstrogène (CreERT2) et permet de contrôler par l'administration de Tamoxifène la fenêtre temporelle durant laquelle a lieu la recombinaison. Ces constructions *inductibles* sont très utilisées pour l'étude de la neurogenèse adulte car une grande partie des gènes impliqués dans ce processus sont également exprimés lors de l'embryogenèse (ex : *Sox2*, *Nestin*, *GFAP*, *Tbr2*, etc.) (Dhaliwal and Lagace, 2011).

Au regard de ces considérations, la lignée *Prss56^{Cre}* présente un patron de recombinaison extraordinairement restreint pour une lignée Cre non-inductible. La faible quantité de cellules du SNC qui exprime la protéine rapportrice suggère que seules quelques sous-populations de cellules souches expriment le gène *Prss56* tout au long de la vie. Quels avantages apportent ce patron de recombinaison particulier pour l'étude des cellules souches neurales et de la neurogenèse adulte ?

Tout d'abord durant l'embryogenèse, notre système permet de travailler avec un nombre limité de cellules de glie radiaire spécifique du pallium médial (GD, CA3, CA et cortex médial). Contrairement à d'autres systèmes (ex : *Nestin-CreERT2*), l'utilisation de notre lignée permettrait de cibler un nombre limité de cellule et ne devrait pas affecter le développement normal de la structure. L'inactivation sous le contrôle de *Prss56^{Cre}* de gènes impliqués dans la neurogenèse (p. ex. avec des allèles floxés des gènes *Nestin*, *GFAP*, *Mash1*, *Neurogenin2*, *Tbr2*, *Nfl*, etc.) permettrait d'évaluer leurs influences sur la destinée cellulaire et notamment sur l'établissement des cellules souches adultes dans la SGZ, et leurs fonctionnements après la naissance (Subramanian et al., 2011; Hodge et al., 2012; Iwano et

al., 2012; Hodge et al., 2013; Yu et al., 2014). Il serait bien sûr intéressant de conduire des études similaires au niveau des lignages cellulaires tracées dans la SVZ et l'hypothalamus, notamment pour déterminer quels facteurs déterminent le maintien des cellules souches après la naissance dans la zone ventriculaire de ces deux niches.

D'autre part, j'ai montré qu'environ 22% des neuroblastes sont tracés par notre système dans la RMS et que ces cellules génèrent majoritairement des cellules granulaires profondes du BO. L'ablation permanente de ces cellules, par exemple par l'expression d'une toxine sous contrôle de *Prss56^{Cre}*, permettrait d'évaluer spécifiquement l'importance du renouvellement postnatal des cellules granulaires profondes dans le fonctionnement du système olfactif. Notre système de traçage endogène est également un bon outil pour déterminer les effets cumulatifs à long terme d'une condition donnée (p. ex. administration de drogue, modification comportemental, modèle neuro-dégénératifs, etc.) sur la neurogenèse adulte du BO. Enfin, nous avons démarré un projet visant à étudier l'impact de certains modèles pathologiques sur la neurogenèse adulte de la SVZ : ischémie, lésion *stab wound*, etc. Notre système permet en effet de suivre la migration ectopique des neuroblastes tracés vers les sites affectés et pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi ces cellules échouent à régénérer les tissus lésés.

En conclusion, j'ai découvert que l'expression du gène *Prss56* est intimement liée à la présence des niches neurogéniques. L'étude de son patron de traçage m'a permis d'apporter une nouvelle vision sur le développement, l'hétérogénéité et le fonctionnement des cellules souches neurales adultes. Je suis conscient que certaines de mes observations, obtenues avec la lignée *Prss56^{Cre}*, ne font qu'effleurer certains mécanismes et mériteraient encore quelques approfondissements. La poursuite de ce projet et de l'étude de la neurogenèse adulte bénéficieront sans doute du développement d'outils complémentaires basés sur le locus *Prss56*.

ANNEXES

Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin

Aurélie Gresset^{1,4}, Fanny Couplier^{1,4}, Gaspard Gerschenfeld^{1,3}, Alexandre Jourdon^{1,3}, Graziella Matesic¹, Laurence Richard², Jean-Michel Vallat², Patrick Charnay¹ and Piotr Topilko¹

¹Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), and Inserm U1024, and CNRS UMR 8197, Paris, F-75005, France

²National Reference Centre “Rare Peripheral Neuropathies” Department of Neurology, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, 87042 Limoges, France

³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IFD, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05

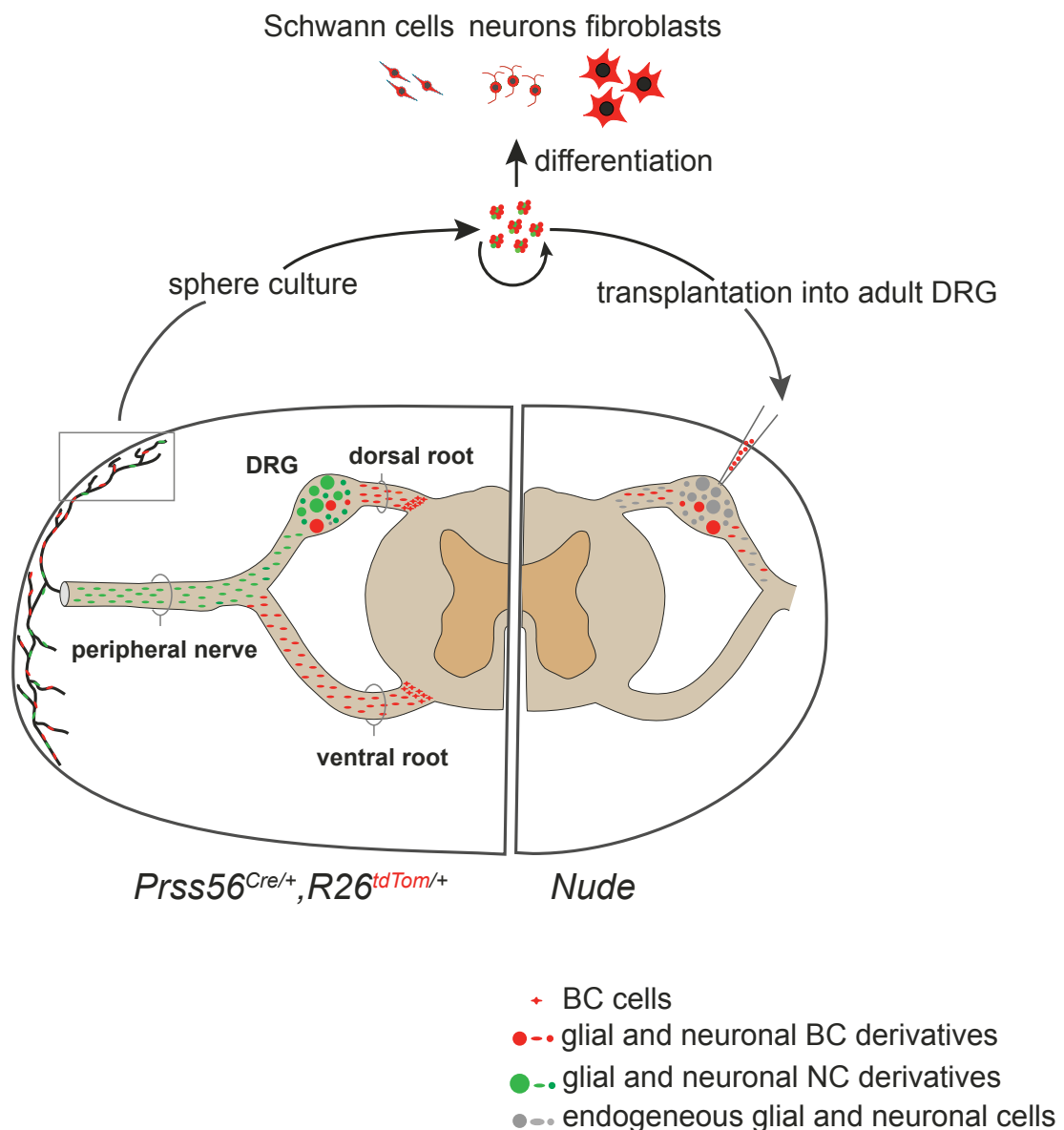
⁴Co-first author

Correspondence should be addressed to Patrick Charnay: patrick.charnay@ens.fr

Running title: Origin and potential of skin neural stem cells

ABSTRACT

While neurogenic stem cells have been identified in rodent and human skin, their manipulation and further characterisation are hampered by lack of specific markers. Here, we perform a genetic tracing of the progeny of boundary cap (BC) cells, a neural crest-derived cell population localized at peripheral nerve entry/exit points. We show that BC derivatives migrate along peripheral nerves to reach the skin, where they give rise to terminal glia associated with dermal nerve endings. Dermal BC derivatives also include cells that self-renew in sphere culture and have broad *in vitro* differentiation potential. Upon transplantation into adult dorsal root ganglia, skin BC derivatives efficiently differentiate into various types of mature sensory neurons. Together, this work establishes the embryonic origin, pathway of migration and *in vivo* neurogenic potential of a major component of dermal stem-like cells. It provides genetic tools to study and manipulate this population of high interest for medical applications.



INTRODUCTION

The neural crest (NC) is an embryonic, multipotent cell population that migrate extensively through the periphery and give rise to various cell lineages, including most of the glial and neuronal components of the peripheral nervous system (PNS) (Le Douarin and Kalcheim, 1999). NC cell settlement is normally accompanied by restriction to particular cell fates (Krispin et al., 2010; Le Douarin and Dupin, 2003; Le Douarin and Kalcheim, 1999). However, recent studies have identified stem cell-like populations within adult NC targets, which show developmental potentials resembling those of NC cells (Dupin and Sommer, 2012; Le Douarin and Kalcheim, 1999). Among these populations, adult multipotent skin stem cells have attracted particular attention because they are easy to access, which would facilitate their use in regenerative medicine.

Fate-mapping studies have revealed the existence of different types of trunk skin stem cell populations that possess neurogenic and gliogenic potential, with both NC and non-NC origins. Stem cells confined to the dermal papillae of hair follicles originate from the mesoderm, whereas populations restricted to the glial and melanocyte lineages are derived from the NC (Fernandes et al., 2004; Jinno et al., 2010; Krispin et al., 2010; Le Douarin and Dupin, 2003; Wong et al., 2006). These different cell populations can be cultured as floating spheres and generate neurons and Schwann cells under differentiation conditions (Biernaskie et al., 2007; Fernandes et al., 2004; Wong et al., 2006). However lack of specific markers has prevented their detailed localization and further characterization and purification.

Another type of NC-derived stem cell-like population has been identified in the embryo at the interface between the central and peripheral nervous systems. They form the so-called boundary caps (BC), which are transiently observed at the nerve root entry/exit points along the

neural tube (Niederländer and Lumsden, 1996). Fate analyses, taking advantage of BC-specific expression of the *Krox20* (also known as *Egr2*) transcription factor gene (Wilkinson et al., 1989) and available knock-ins at this locus (Vermeren et al., 2003; Voiculescu et al., 2000), have established that BC cells give rise to the Schwann cell component of the nerve roots and, in the dorsal root ganglia (DRG), to nociceptive neurons as well as glial satellite cells (Maro et al., 2004). Furthermore, in culture, BC cells can generate Schwann cells, myofibroblasts, astrocytes and neurons (Zujovic et al., 2011), and when grafted into the lesioned spinal cord, efficiently migrate toward the lesion and differentiate into functional myelinating Schwann cells (Zujovic et al., 2010). Together these studies indicate that BC cells have a broad differentiation potential and suggest that they constitute multipotent neural stem cells in the embryo.

The above mentioned fate studies relied on the restriction of *Krox20* expression to BC cells during early PNS development. However, from E15.5, *Krox20* is also expressed in Schwann cells (Topilko et al., 1994), thereby preventing later analysis of BC derivatives. To circumvent this problem, we used a novel BC-specific marker, *Prss56* (Coulpier et al., 2009), appropriate for longer-term tracing studies. We have generated a knock-in mouse line expressing Cre recombinase from the *Prss56* locus and use the *Prss56^{Cre}* allele, together with Cre-activable reporter lines, to trace BC cell derivatives in the embryo and the adult. Unexpectedly we find that, during embryogenesis, some of the derivatives of ventral BC cells rapidly migrate along the peripheral nerves and settle in the skin. In the neonatal and adult skin, these BC derivatives provide the terminal glia associated with dermal nerve endings. Furthermore, these glial derivatives include multipotent progenitors that can self-renew in sphere culture and differentiate into various cell types, including neurons and Schwann cells. Transplanted into the DRG of adult mice, skin BC derivatives efficiently differentiate into various types of mature sensory neurons. Together these studies reveal the embryonic origin, pathway of migration and in vivo neurogenic

potential of a multipotent neural stem cell-like population in the skin. In addition, this work provides novel tools for further characterization and manipulation of dermal terminal glia and skin stem cells.

RESULTS

Dorsal root BC cells give rise to the different neuronal lineages in the DRG

The generation of the *Prss56*^{Cre} allele is presented in Fig. S1A. Absence of *Prss56* mRNA in BCs from *Prss56*^{Cre/Cre} embryos indicated that the mutation represents a null allele for *Prss56* (Fig. S1C, D). Homozygous mutant animals are fertile and do not show any obvious phenotype in the PNS. As a first step to characterize this novel marker, we compared the progeny of *Krox20*- and *Prss56*-expressing BC cells in the early PNS. We combined the *Krox20*^{Cre} (Voiculescu et al., 2000) or *Prss56*^{Cre} alleles with the *R26*^{tdTom} locus (Fig. S1B), in which Cre recombination leads to permanent activation of the tandem dimer tomato (tdTom) fluorescent reporter (Madisen et al., 2009). We then searched for labeled cells in the nerve roots and DRG between E11 and E13.5. Using the *Krox20*^{Cre} driver, we confirmed that the first traced cells appear in the ventral root before E11 (Fig. 1A and data not shown), whereas labeled cells appear in the dorsal root around that stage and in the DRG later on (Fig. 1A-C and (Maro et al., 2004)). In contrast, in *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} embryos, the first labeled cells appear in the dorsal root and in the dorsal part of the DRG around E11 (Fig. 1D). Labeled cells along the ventral root only appear at later stages (Fig. 1E, F). In the nerve roots, labeled cells from both tracing systems give rise to Sox10-positive Schwann cell precursors (Fig. S2A, B and (Maro et al., 2004)). In the DRG, both types of traced cells give rise to putative neurons with extending axons (Fig. S2C, D). Neurogenesis in the DRG involves two phases, with mechanoreceptive and proprioceptive neurons emerging first, followed by nociceptors (Marmigère and Ernfors, 2007). We have previously shown that the only neurons generated by *Krox20*-expressing BC derivatives in the DRGs are nociceptors (Maro et al., 2004). To identify the neuronal derivatives of the *Prss56*-expressing BC cell population, DRG sections from E18.5 *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} embryos were analyzed by co-immunostaining

with antibodies against tdTom and TrkA (nociceptive), TrkB (mechanosensitive) or TrkC (proprioceptive) neurotrophic receptors. We found that traced cells include all three types of neurons (Fig. 1G-I). Quantification indicates that they represent $9.8 \pm 1.9\%$, $6.3 \pm 2.8\%$ and $13.3 \pm 4.6\%$ of the TrkA-, TrkB- and TrkC-positive neuronal populations, respectively. The observation of mechanosensitive and proprioceptive neurons among BC derivatives traced with the *Prss56* driver is consistent with the presence of traced cells in the DRG from E11 (Fig. 1D), when these neuronal types are generated (Marmigère and Ernfors, 2007).

Ventral root BC derivatives migrate along the peripheral nerves to the skin

We noticed that from E11.5, in *Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom}* embryos, some labeled cells are located in the proximal part of the ventral ramus (VR) (Fig. 2A), suggesting that the migration of BC derivatives of the ventral root may extend beyond the root. To investigate this possibility, transverse sections from *Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom}* embryos at brachial, thoracic and lumbar levels were immunostained for tdTom and β III-tubulin, a neuronal/axonal marker, at successive stages of development (Fig. 2). At E11.5, labeled cells are present in the ventral root and in the proximal part of the VR of all spinal nerves (Fig. 2A). At E11.75, labeled cells have accumulated in the distal part of the elongating VR and a few traced cells are detected in the proximal segment of the growing dorsal ramus (DR) (Fig. 2B). At E12-E12.5, sparse labeled cells are present along the extending spinal nerves (Fig. 2C, D). From E12.5-E13, labeled cells are observed at the level of the skin (Fig. 2D, E). Subsequently, their number considerably increases in the cutaneous nerves in both the dorsal (Fig. 2F) and ventral (Fig. 2G) skin. From these stages, labeled cells are concentrated at both extremities of the somatosensory nerves (root and cutaneous segments) and have almost disappeared from the central segments (Fig. 2F, G).

The spatial-temporal distribution of the labeled cells along spinal nerves suggests a wave of migration from the BCs to the skin along the peripheral nerves, between E11.5 and E13. To rule out the possibility that some cells in the skin might activate *Prss56* de novo, we performed in situ hybridization and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses on skin preparations at E13.5, when a large number of labeled cells have accumulated in the skin. *Prss56* mRNA was not detected in the skin by either procedure (Fig. S3A, B), suggesting that *Prss56* is not expressed in the skin labeled cells.

In conclusion, our data strongly suggest that the labeled cells present in the skin are derived from the BCs and arrive by rapid migration along the ventral root and the spinal nerves.

Skin BC derivatives include different types of Schwann-like cells

To investigate the distribution and identity of BC derivatives in the trunk skin after birth, we first performed a whole mount immunohistochemistry analysis of *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} newborn dorsal skin preparations, staining for tdTom and β III-tubulin. This revealed a dense network of traced cells exclusively associated with the nerves in the hypodermis and dermis (Fig. 3A). In the subcutaneous nerves, some of the traced cells express the myelin marker MBP (Fig. 3B), suggesting that they are myelinating Schwann cells.

Staining of transverse sections for β III-tubulin and PGP9.5, an axonal marker present in terminal endings, confirmed the systematic association of the labeled cells with dermal nerves (Fig. 3C, D). In the dermis, these traced cells express the immature glial marker p75^{NGFR} (Fig. 3E) and the Schwann cell marker S100 (Fig. 3F), but not the myelin marker MBP (data not shown), and are therefore immature/non-myelinating Schwann cells. They could be classified into three categories: those associated with dermal nerve fibers (Fig. 3A, E, closed arrows),

lanceolate endings around hair follicles (Fig. 3C, D, F, empty arrowheads) and “free” nerve endings of nociceptive fibers (Fig. 3C, D, G, closed arrowheads). Lanceolate endings are circumferential structures that surround the hair follicle and are composed of mechanoreceptive nerve fibers and their associated terminal Schwann cells, whose function is poorly understood (Li and Ginty, 2014; Takahashi-Iwanaga et al., 2008). Traced cells at the free nerve endings of nociceptive fibers show an atypical morphology, with the soma localized in the upper part of the dermis, close to the epidermis, while a dense network of cytoplasmic protrusions penetrates the dermis and epidermis and follows the path of nerve terminals (Fig. 3G). These cytoplasmic protrusions are often in close contact with blood vessels in the dermis (Fig. 3H). These cells are likely to correspond to the teloglia, which was once described by Cauna, but not further investigated (Cauna, 1973; 1980). Interestingly, while some traced cells associated with the lanceolate endings express the progenitor/stem cell marker nestin, this is not the case for any of those associated with the free nerve endings (Fig. 3I).

In the adult skin, the distribution and immunohistological signature of traced cells along the neuronal cutaneous network was comparable to that of newborns (data not shown). We characterized adult BC derivatives in the hypodermis using electron microscopy. For this purpose, we used *Prss56^{Cre/+},R26^{lacZ}* animals, where Cre recombination leads to permanent expression of β -galactosidase, which can convert the Bluogal substrate into electron-dense precipitates (Weis et al., 1991). Analysis of subcutaneous nerves confirmed that the majority of the labeled cells are non-myelinating Schwann cells (Fig. 3J), but also identified a few myelinating Schwann cells, as observed in the newborn (Fig. 3B), and endoneurial fibroblasts, characterized by the absence of basal lamina (Fig. 3J, K).

Together, our data indicate that BC cell derivatives in neonatal and adult skin consist mainly of Schwann cells, most of them non-myelinating, and some endoneurial fibroblasts. Among the Schwann cells, some are associated with the dermal nerve fibers and others with nerve terminals, either lanceolate endings or free endings.

Dermal BC derivatives can be propagated in sphere cultures and are multipotent

NC-derived progenitor/stem cells that express p75^{NGFR} and Sox10 have been described in the mouse and human skin (Wong et al., 2006). These characteristics are similar to those of skin BC derivatives (Fig. 3E and Fig. S3c) and led us to investigate whether BC derivatives show stem cell-like properties. For this purpose, we performed floating sphere cultures from the back skin of *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} newborn mice, as this technique has been previously used to isolate stem cells in the skin (Toma et al., 2001; 2005; Wong et al., 2006). Back skin was dissociated by enzymatic and mechanical treatments and cultured in non-adhering conditions. Numerous floating spheres were observed after 7-10 days in culture and could be propagated for at least 11 passages (Fig. 4A). We used our tracing system to monitor BC derivatives over time in these cultures. While tdTom-positive cells only represent 0.1% of the cells recovered after skin dissociation, their proportion increases during successive passages to reach approximately 80% of the sphere population at P10 (Fig. 4A, B). In addition, tdTom-positive cells from spheres express immature/stem cell markers, including nestin, p75^{NGFR}, vimentin, and fibronectin, but not the central nervous system progenitor marker Olig2 (Fig. S4A-E).

The rapid increase in the proportion of tdTom-positive cells during the early passages might reflect either a proliferative advantage of traced cells, or a de novo activation of the *Prss56* locus in previously unlabeled cells. To distinguish between these two possibilities, we first looked for *Prss56* expression by semi-quantitative RT-PCR in cells freshly isolated from

newborn skin or maintained in sphere culture for 2, 4, 8 and 11 passages (Fig. S4F, G). We did not detect any expression of the gene at any time. To avoid a possible dilution of the RT-PCR signal from rare stem cells at early culture stages, we enriched the initial culture in tdTom-positive stem cells by immuno-panning, taking advantage of the fact that they derive from p75^{NGFR}-positive cells (see below). Once again, no *Prss56* expression was observed either immediately after immuno-panning or after 36 h culture in sphere conditions (Fig. S4g). Together these data are inconsistent with de novo activation of *Prss56* in culture conditions and rather support a proliferative advantage for the traced cells. In agreement with this interpretation, immunostaining analysis with the mitotic marker phospho-histone H3 showed that more than 97% of the floating tdTom-positive cells express this marker after 36 h in culture (data not shown), indicating that these cells are highly proliferative.

We next analyzed the differentiation potential of cultured tdTom-positive cells. Cells from neonatal *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} skin were maintained in culture for two (P2) or five (P5) passages, mechanically dissociated and cultured for two additional weeks in the presence of serum, which promotes their spontaneous differentiation. They were then analyzed according to their morphology and by immunostaining with antibodies against tdTom, and neuronal (β III-tubulin), Schwann cell (S100), and myofibroblast (SMA and fibronectin) markers. In both P2 and P5 cultures, numerous neurons, myofibroblasts, as well as rare Schwann cells and adipocytes, were observed among the traced population (Fig. 4C-H). Addition of the Schwann cell mitogens forskolin and heregulin to the sphere culture medium greatly enhanced the capacity of spheres to differentiate into Schwann cells (Fig. 4I).

We investigated whether these BC derivatives with stem cell properties are maintained in the adult skin. Traced cells in the adult skin were slightly more abundant (0.6% of the total initial

population) than in neonatal skin. Sphere cultures performed with adult skin showed similar proliferation and differentiation properties (Fig. 4B, C).

As skin BC derivatives comprise both glial and fibroblast cells, we wondered whether the stem cells belonged to one or the other population. By magnetic immuno-panning against p75^{NGFR} for glial cells and Thy1 for fibroblasts (Manent et al., 2003), we isolated each cell type, as well as the double negative population, from newborn skin and performed sphere cultures. Spheres containing numerous traced cells were obtained from both glial and fibroblastic populations, but not from the double-negative fraction (data not shown). In differentiation conditions, the p75^{NGFR}-positive population gives rise to a similar distribution of cell types as without fractionation, whereas neuronal and glial derivatives are absent from the derivatives of the Thy1-positive population (Fig. 4C). To further identify the skin tissue layer housing the stem cells, we performed sphere cultures from the hypodermis of neonatal *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} mice after magnetic fractionation with p75^{NGFR} antigens. This fraction failed to form spheres (data not shown), suggesting that the p75^{NGFR}-positive stem cells are restricted to the dermis.

In conclusion, BC derivatives in neonatal skin include a dermal, p75^{NGFR}-positive stem cell-like population that shows a broad differentiation potential and persists in the adult.

Skin BC derivatives grafted into the DRG efficiently differentiate into sensory neurons

To investigate the in vivo differentiation potential of skin BC derivatives, we first performed transplantations into adult DRG. Newborn skin was dissociated and cultured in sphere conditions for 10 days. tdTom-positive cells were then purified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and injected into the L4 or L5 DRG of nude mice (2x10⁴ traced cells/DRG). Mice were sacrificed 30 days after grafting and the injected DRGs were analyzed for the presence of tdTom-positive cells. Out of the 30 mice injected, 27 showed numerous tdTom-positive cells in the

injected DRGs. Within the successfully injected DRGs, most traced cells were positive for the neuronal marker β III-tubulin (Fig. 5A, B) and represented $12 \pm 1.0\%$ of all neurons in the DRG. Traced neurons were further characterized with markers of different categories of mature DRG neurons (Lallemend and Ernfors, 2012) and represented a large array of sensory neurons: peptidergic (CGRP-positive, Fig. 5C) and non-peptidergic (binding isolectin B4, Fig. 5D) nociceptors, unmyelinated mechanoreceptors (tyrosine hydroxylase-positive, Fig. 5E), TrkA-positive neurons (Fig. 5F), which include lightly myelinated nociceptors and a subpopulation of peptidergic nociceptors, Ret-positive neurons (Fig. 5G), which include myelinated mechanoreceptors, and a subpopulation of peptidergic and non-peptidergic nociceptors, and TrkC-positive neurons (Fig. 5H), which include subpopulations of myelinated proprioceptors and mechanoreceptors. Furthermore, immunostaining for β III-tubulin in transverse sections through the dorsal root attached to the injected DRG revealed numerous tdTom-positive axons (Fig. 5K), indicating that at least some of the traced neurons had generated long projections. Together these data indicate that the grafted cells efficiently differentiate into mature sensory neurons.

Other types of traced cells were observed within the DRG: small, elongated, p75^{NGFR}-positive cells in close contact with neuronal somata, which are glial satellite cells (Fig. 5I), cells positive for the proteoglycan NG2 (Fig. 5J), which is produced by perineurial and endoneurial fibroblasts in the rat adult sciatic nerve (Morgenstern et al., 2003; Rezajooi et al., 2004), and a layer of cells surrounding the DRG, whose identity remains unknown (Fig. 5A). Finally, numerous tdTom-positive cells were observed in the dorsal root and spinal nerve attached to the injected DRG, indicating that injected cells had migrated away from the injection site (Fig. 5L and data not shown). These cells form a dense network around the Schwann cell-axon bundles, and are negative for immature (S100, Fig. 5M) or myelinating (MBP, Fig. 5N) Schwann cell

markers, but are positive for NG2 (Fig. 5O). Therefore, traced cells also differentiate into endo/perineurial-like fibroblasts in the dorsal root and the spinal nerve.

In conclusion, our results indicate that, following injection into adult DRG, skin BC derivatives efficiently colonize the DRG and part of the spinal nerve and give rise to different cell types, including a variety of sensory neurons, as well as glial cells and fibroblasts.

Skin BC derivatives grafted into lesioned nerves give rise to endo/perineurial and Schwann cells

To investigate whether skin BC derivatives could also differentiate in vivo into Schwann cells when provided with an appropriate environment, we performed transplantations into the cryo-lesioned sciatic nerves of nude mice. Sciatic nerve lesions are known to enable recruitment of Schwann cells (Coleman, 2005). tdTom-positive cells were prepared as for DRG transplantations and grafted into the lesion site. Six weeks later, numerous traced cells were within the lesion site (Fig. 6A), as well as in the proximal part of the nerve, indicating that traced cells had efficiently colonized the lesioned nerve. Analyses of transverse and longitudinal nerve sections indicated that grafted traced cells are not in direct contact with the regenerated axons and are negative for markers for immature (S100, Fig. 6A) and myelinating (MBP, Fig. 6B) Schwann cells. Most traced cells appear to wrap single axon/Schwann cell units (Fig. 6A, B, closed arrows), in a manner similar to endoneurial fibroblasts (Rezajooi et al., 2004). Some traced cells are also at the level of the perineurium (Fig. 6A, arrowheads), ensheathing fascicles composed of axons, their associated Schwann cells and the surrounding endoneurium. Consistent with these observations, the traced cells are positive for the NG2 marker (Fig. 6C). They are similar to the labeled cells observed in the dorsal roots attached to the injected DRGs (Fig. 5O). Thus, after transplantation into the injured sciatic nerve, tdTom-positive cells do not engage into the glial pathway and

differentiate preferentially into endo/perineurial-like fibroblasts.

We finally asked whether exposing tdTom-positive cells to factors promoting a Schwann cell fate prior to transplantation would modify this situation. Skin-derived spheres were maintained for two weeks in presence of forskolin and heregulin, then dissociated and injected into the injured sciatic nerve. Six weeks after transplantation, although most traced cells were NG2-positive fibroblastic cells (Fig. 6D-F), we observed some S100-positive Schwann cells (Fig. 6D, open arrows), which had remained immature, as they did not express the MBP myelin marker (Fig. 6E). In conclusion, in the lesioned sciatic nerve environment, grafted BC-derived skin stem cells mainly engage into an endo/perineurial fibroblastic fate, although in vitro treatment with Schwann cell fate promoting factors redirects some of them toward the glial pathway.

DISCUSSION

The present study builds on previous observations that the NC contribution to PNS formation occurs in two waves (Maro et al., 2004), with one population migrating directly to their target locations, while the other makes a stop at the level of the BCs. In contrast to what was previously thought (Maro et al., 2004), we establish that the two waves make similar qualitative contributions in terms of neuronal subtypes in the DRG; the physiological significance of this dual origin is not clear. In contrast, along peripheral nerves of the trunk, the BCs provide the entire proximal Schwann cell nerve root component, as well as a large part of the glia covering the distal parts of skin nerves, whereas the direct NC contribution appears largely restricted to the intermediate part of the nerves. These distinct origins may underlie functional differences between glial populations at different levels along the nerves.

In the skin, we have shown that BC derivatives give rise to at least three populations of glia: Schwann cells (mainly non-myelinating) associated with subcutaneous and dermal nerves, and two types of terminal Schwann cells, associated with lanceolate endings or free nerve endings. Lanceolate endings are specialized sensory organs that detect hair movement (Li et al., 2011; Lou et al., 2013). They form a palisade structure surrounding the hair follicle and are composed of terminal fibers carrying rapidly-adapting low-threshold mechanoreceptors ($A\beta$, $A\delta$, and C) (Abraira and Ginty, 2013). The terminal Schwann cells are involved in the maintenance of the lanceolate complex (Li and Ginty, 2014) and could play a role in calcium signaling (Takahashi-Iwanaga et al., 2008), but their detailed functions still need further investigation.

Free nerve endings are non-specialized cutaneous sensory receptors that are involved in perception of touch, pressure and pain (Abraira and Ginty, 2013). In contrast to their name, free

nerve endings are also associated with terminal Schwann cells. Terminal Schwann cells have only been studied by electron microscopy and present a very peculiar morphology, with numerous cytoplasmic protrusions covering the axons at the dermis/epidermis boundary (Cauna, 1973; 1980). We provide here the first genetic marker and optical observations of these cells. Their morphology resembles that of perisynaptic Schwann cells (PSC), which cap motor nerve terminals at the neuromuscular junction (Balice-Gordon, 1996). PSC are involved in sensing and modulating synaptic transmission through the specific expression of neurotransmitter receptors and ion channels on their surface (Auld and Robitaille, 2003). Given their similarity with PSCs in terms of terminal location and morphology, we speculate that Schwann cells associated with free nerve endings might play a direct role in depolarizing axon membranes. The *Prss56^{Cre}* line allows easy identification of these atypical Schwann cells and should facilitate their detailed characterization, including the analysis of their biochemical, electrophysiological and functional properties.

In the dermis, the glial, p75^{NGFR}-positive BC derivatives also include a neurogenic and gliogenic stem cell-like population. Two types of NC-derived multipotent stem cell-like populations have been previously described in the adult trunk skin, associated with the glial and melanocyte lineages (Wong et al., 2006). Our results indicate that the BC-derived population constitutes a major component of dermal stem-like cells, as they represent approximately 80% of the sphere population at late passage, when the stem cell population has been largely enriched. Our work is consistent with recent observations indicating that human adult dermal stem cells with neurogenic potential express p75^{NGFR} and can be ascribed to the Schwann cell lineage (Etzaniz et al., 2014). Together our results establish the precise origin of these dermal stem cells and provide a unique and specific genetic tool for their identification, and further study and manipulation.

Most importantly, grafting experiments establish that this stem cell-like population can efficiently differentiate into various types of mature sensory neurons in the adult DRG. The differentiated neurons survive at least two months and many extend long axons in the dorsal root and spinal nerve, although it remains to be determined whether these axons establish specific connections in the spinal cord. Such a neurogenic potential has never been reported for skin-derived stem cells and it raises the possibility that these cells may manifest an even larger plasticity (e.g. generation of central glia and neurons) if offered the appropriate cellular environment. The fact that these stem cells give rise to a very different distribution of cell types (only endo/perineurial fibroblasts and Schwann cells) upon transplantation into a lesioned sciatic nerve is consistent with such plasticity.

In conclusion, our work opens the way for a detailed analysis of a major population of dermal stem cells that are derived from the BCs, have powerful neurogenic potential and, because of their accessibility, constitute valuable candidates for regenerative medicine. The specific genetic tools developed in the current study should be instrumental for further characterization and manipulation of this promising cell population.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse lines, genotyping and ethical considerations

All mouse lines were maintained in a mixed *C57BL6/DBA2* background. We used the following alleles or transgenes that were genotyped as indicated in the original publications: *Krox20^{Cre}* (Voiculescu et al., 2000), *Rosa26^{lacZ}* (Soriano, 1999), *Rosa26^{tdTom}* (Madisen et al., 2009). *Prss56^{Cre}* was generated in this work (see Fig. S1). Genotyping was performed by PCR on tail DNA using primers described in Table S1. Day of the plug was considered E0.5. Animals were sacrificed by decapitation (newborn) or cervical dislocation (adult) unless indicated otherwise. All animal manipulations were approved by a French Ethical Committee (Project # Ce5/2012/115) and were performed according to French and European Union regulations.

In situ hybridization and immunofluorescence

In situ hybridization on embryos was performed as previously described, using digoxigenin-labeled RNA probes synthesized by PCR (Coulpier et al., 2009). Immunohistochemical analysis of embryos was performed on 100 µm transverse vibratome sections that were stored at -20°C in phosphate buffer including 30% glycerol and 30% ethylene glycol. Cryosection and immunolabeling of newborn and adult nerve roots, DRGs, subcutaneous nerves and skin were performed as described previously (Decker et al., 2006). Sections were mounted in Aqua poly/Mount (PolySciences) and optical sections of fixed samples were obtained on a confocal microscope (SP5, Leica). The ImageJ software (Schneider et al., 2012) was used to generate Z-stacks and analyze data (co-localisation). When required, images were subjected to brightness and contrast adjustment to equilibrate channel intensities and background using Photoshop CS6

software (Adobe). For quantification of tdTom-positive cells, at least five areas per structure per animal were photographed, and the number of tdTom-positive cells relative to the total number of cells expressing a given marker was determined. The results are given as median \pm standard error of the mean (s.e.m). The antibodies are described in the supplemental information. Nuclei were counterstained with Hoechst (33342, Sigma).

Cell culture and immuno-panning

Sphere cultures were performed from neonatal and adult (6-8-week old) *Prss56^{Cre/+}, R26^{tdTom}* mice as previously described (Biernaskie et al., 2007). Briefly, the back skin was carefully dissected free of other tissue, cut into 2-3 mm³ pieces, and then digested with collagenase/dispase type I (Sigma/Roche) for 2 h at 37°C. Skin samples were then washed with medium (DMEM-F12, 3:1, containing 1 μ g/ml fungizone and 1% penicillin/streptomycin, all from Invitrogen, and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL). Samples were then mechanically dissociated in serum-free medium, and the cell suspension was passed through a 30 μ m cell strainer (Miltenyi). Dissociated cells were resuspended at 4x10⁴ cells/ml in B-27 (Invitrogen) medium without vitamin A supplement, containing 20 ng/ml EGF and 40 ng/ml bFGF (both from Sigma), referred to as proliferation medium. Cultures were fed every 4 days, by addition of 1/10 of fresh medium containing growth factors and supplements. Spheres were passaged every 7-10 days. To passage floating spheres, the medium containing the spheres was centrifuged, the pellet was mechanically dissociated, and cells were re-plated at 4x10⁴ cells/ml in a 1/1 mix of fresh and filtered conditioned proliferation medium. For spontaneous differentiation, spheres were centrifuged, washed from the proliferation medium, plated in fresh medium (DMEM-F12, 3:1, containing 10% FBS) onto 4-well Nunc culture slides coated with poly-D-lysine/laminin, and maintained for

15 days in the same medium. For induced glial differentiation, spheres were plated in proliferation medium with 10% FBS, supplemented with 20 ng/ml EGF and 40 ng/ml bFGF, for three days. The medium was then changed to DMEM-F12, 3:1, 1% FBS, 1% N2 supplement (Invitrogen), 50 ng/ml heregulin (Sigma) and 4 μ M forskolin (Sigma). The cultures were maintained for two weeks and the differentiation medium was changed every 2 days.

For immuno-panning, cell suspensions from neonatal back skin were prepared as described above. Dissociated cells were first purified by magnetic cell sorting using an antibody against p75^{NGFR} (1:200, Abcam) as previously described (Manent et al., 2003). The negative fraction was collected and purified in the same way with an antibody against Thy1 (1:200, BD Pharmingen). After purification, the p75^{NGFR}- and Thy1-positive fractions were counted and resuspended in proliferation medium.

Purified Schwann cells were obtained from 2-week old *Krox20*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} mice. The sciatic nerves were collected, maintained in Wallerian degeneration conditions for 10 days in Schwann cell medium (DMEM, 10% FBS supplemented with 2 μ M forskolin and 10 ng/ml heregulin), then dissociated for 3 h in digestion solution (collagenase type I, 130 U/ml; dispase type I, 2.5 mg/ml) on a rocking table at 37°C. The cells were then plated onto polyL-lysine/laminin coated dishes and cultured in Schwann cell medium until purification by magnetic immuno-panning based on their specific expression of the p75^{NGFR} antigen as above.

FACS sorting

tdTom-positive cells were isolated from neonatal skin cell preparations and cultured as floating spheres as described above. Primary spheres were mechanically dissociated and the resulting cell suspension (3x10⁶ cells/ml) was purified on a FACS Vantage (Becton-Dickinson, Mountain View,

CA) equipped with an argon laser tuned to 561 nm. Dead cells and doublets were excluded by gating on forward scatter and side scatter area versus width. Log RFP fluorescence was acquired through a 530/30 band pass. tdTom-positive cells were sorted directly into culture medium until use in transplantation assays. To verify the purity of the sorted cells, aliquots were seeded onto coverslips and analyzed by immunohistochemistry with anti-tdTom antibody.

Transplantations into the DRGs and sciatic nerve

Adult nude mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of Ketamine (Imalgene 500, 0.5 µl/g) and Xylazine (Rompun 2 %, 0.2 µl/g) before surgery. In addition, local anesthesia was applied (Lidocaine). tdTom-positive cells were prepared from neonatal skin, cultured for ten days in sphere conditions, purified by FACS and immediately injected.

For transplantation into the DRG, the lower lumbar vertebral column was exposed by a midline incision of the skin and fascia, and the right L4 or L5 DRG was exposed via a hemilaminectomy. A suspension containing $2 \cdot 10^4$ tdTom-positive cells (10^4 cells/µl) was injected into the DRG. After one month, the animals were injected with a lethal dose of Ketamine and Xylazine and perfused with saline, followed by a fixative solution containing 4% PFA in PBS. The DRG with the attached nerve roots and spinal nerves was dissected, post-fixed in 4% PFA for 3 h and cryoprotected overnight in PBS containing 15% sucrose. Serial 14 µm cryosections were prepared, placed on SuperFrost Plus glass slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany), and stored at -80°C until analysis. In all experiments performed, no traced cells were found in the contralateral DRG. In control experiments, when tdTom-positive Schwann cells isolated from adult *Krox20^{Cre/+}, R26^{tdTom}* sciatic nerves were injected into DRGs, virtually all transplanted cells expressed S100 and corresponded to Schwann cells (data not shown).

For transplantation into the sciatic nerve, the nerve was exposed and crushed 4 times for 10 s with forceps chilled in liquid nitrogen. A suspension containing 10^5 tdTom-positive cells ($5 \cdot 10^4$ cells/ μ l) was immediately injected into the lesion site. After six weeks, the animals were sacrificed and the injected sciatic nerves were dissected, fixed in 4% PFA for 3 h and cryoprotected overnight. Serial 14 μ m cryosections were prepared and stored at -80°C until analysis. Similar transplantations were performed with spheres pre-treated with heregulin and forskolin for two weeks to induce glial differentiation, as described above. In control experiments, when tdTom-positive Schwann cells isolated from the adult *Krox20*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} sciatic nerves were injected into the lesioned sciatic nerve, most transplanted cells expressed S100 and corresponded to Schwann cells.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

A.G., F.C., P.T., and P.C. designed the experimental paradigm. A.G., F.C., G.G., A.J., G.M., L.R. and P.T. performed the experiments. A.G., F.C., G.G., J-M.V., P.C., and P.T. analyzed the data. A.G., P.C., and P.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christo Goridis, James Cohen and Pascale Gilardi for critical reading of the manuscript. We are grateful to the IBENS Imaging Facility, supported by grants from the Région Ile-de-France DIM NeRF 2009, to the IBENS mouse facility, and to the cell sorting platform of the Curie Institute for technical assistance. Work in the P.C. laboratory has been supported by the Institut National de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et Technologie (MRT), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Association Française contre les Myopathies, and the Association de Recherche sur le Cancer. A.G. has been supported by the Fondation Pierre Gilles de Gennes, FRM (SPF20101221087), MRT and LABEX MemoLife.

REFERENCES

- Abraira, V.E., and Ginty, D.D. (2013). The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* 79, 618–639.
- Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Junction: Nerve- and Activity-Dependent Contributions to Synaptic Efficacy, Plasticity, and Reinnervation. *Neuroscientist* 9, 144–157.
- Balice-Gordon, R.J. (1996). Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Curr. Biol.* 6, 1054–1056.
- Biernaskie, J.A., McKenzie, I.A., Toma, J.G., and Miller, F.D. (2007). Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc* 1, 2803–2812.
- Cauna, N. (1973). The free penicillate nerve endings of the human hairy skin. *Journal of Anatomy* 115, 277–288.
- Cauna, N. (1980). Fine morphological characteristics and microtopography of the free nerve endings of the human digital skin. *Anat. Rec.* 198, 643–656.
- Coleman, M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 889–898.
- Coulpier, F., Le Crom, S., Maro, G.S., Manent, J., Giovannini, M., Maciorowski, Z., Fischer, A., Gessler, M., Charnay, P., and Topilko, P. (2009). Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers. *Glia* 57, 1450–1457.
- Decker, L., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Taillebourg, E., Ghislain, J., Vallat, J.-M., and Charnay, P. (2006). Peripheral Myelin Maintenance Is a Dynamic Process Requiring Constant *Krox20* Expression. *Journal of Neuroscience* 26, 9771–9779.
- Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. *Developmental Biology* 366, 83–95.
- Etzaniz, U., Vicente, A.P.-S., Gago-López, N., García-Dominguez, M., Iribar, H., Aduriz, A., Pérez-López, V., Burgoa, I., Irizar, H., Muñoz-Culla, M., et al. (2014). Stem Cell Reports. *Stem Cell Reports* 3, 774–788.
- Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6, 1082–1093.
- Jinno, H., Morozova, O., Jones, K.L., Biernaskie, J.A., Paris, M., Hosokawa, R., Rudnicki, M.A., Chai, Y., Rossi, F., Marra, M.A., et al. (2010). Convergent Genesis of an Adult Neural Crest-Like Dermal Stem Cell from Distinct Developmental Origins. *Stem Cells* 28, 2027–2040.

- Krispin, S., Nitzan, E., and Kalcheim, C. (2010). The dorsal neural tube: A dynamic setting for cell fate decisions. *Devel Neurobio* 70, 796–812.
- Lallemend, F., and Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in Neurosciences* 35, 373–381.
- Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion in Genetics & Development* 13, 529–536.
- Le Douarin, N.M., and Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest* (Cambridge University Press).
- Li, L., and Ginty, D.D. (2014). The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *eLife* 3, e01901–e01901.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. *Cell* 147, 1615–1627.
- Lou, S., Duan, B., Vong, L., Lowell, B.B., and Ma, Q. (2013). Runx1 Controls Terminal Morphology and Mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-Mechanoreceptors. *Journal of Neuroscience* 33, 870–882.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2009). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Publishing Group* 13, 133–140.
- Manent, J., Oguievetskaia, K., Bayer, J., Ratner, N., and Giovannini, M. (2003). Magnetic cell sorting for enriching Schwann cells from adult mouse peripheral nerves. *Journal of Neuroscience Methods* 123, 167–173.
- Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 114–127.
- Maro, G.S., Vermeren, M., Voiculescu, O., Melton, L., Cohen, J., Charnay, P., and Topilko, P. (2004). Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat. Neurosci.* 7, 930–938.
- Morgenstern, D.A., Asher, R.A., Naidu, M., Carlstedt, T., Levine, J.M., and Fawcett, J.W. (2003). Expression and glycanation of the NG2 proteoglycan in developing, adult, and damaged peripheral nerve. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24, 787–802.
- Niederländer, C., and Lumsden, A. (1996). Late emigrating neural crest cells migrate specifically to the exit points of cranial branchiomotor nerves. *Development* 122, 2367–2374.
- Rezajooi, K., Pavlides, M., Winterbottom, J., Stallcup, W.B., Hamlyn, P.J., Lieberman, A.R., and Anderson, P.N. (2004). NG2 proteoglycan expression in the peripheral nervous system: upregulation following injury and comparison with CNS lesions. *Molecular and Cellular*

Neuroscience 25, 572–584.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70–71.

Takahashi-Iwanaga, H., Nio-Kobayashi, J., Habara, Y., and Furuya, K. (2008). A dual system of intercellular calcium signaling in glial nets associated with lanceolate sensory endings in rat vibrissae. *J. Comp. Neurol.* 510, 68–78.

Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J.L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778–784.

Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D., and Miller, F.D. (2005). Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. *Stem Cells* 23, 727–737.

Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796–799.

Vermeren, M., Maro, G.S., Bron, R., McGonnell, I.M., Charnay, P., Topilko, P., and Cohen, J. (2003). Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron* 37, 403–415.

Voiculescu, O., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2000). Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* 26, 123–126.

Weis, J., Fine, S.M., David, C., Savarirayan, S., and Sanes, J.R. (1991). Integration site-dependent expression of a transgene reveals specialized features of cells associated with neuromuscular junctions. *The Journal of Cell Biology* 113, 1385–1397.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P. (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337, 461–464.

Wong, C.E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M.T., Rochat, A., Pietri, T., Suter, U., Zimmermann, D.R., Dufour, S., Thiery, J.P., Meijer, D., et al. (2006). Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of Cell Biology* 175, 1005–1015.

Zujovic, V., Thibaud, J., Bachelin, C., Vidal, M., Couplier, F., Charnay, P., Topilko, P., and Baron-Van Evercooren, A. (2010). Boundary Cap Cells are Highly Competitive for CNS Remyelination: Fast Migration and Efficient Differentiation in PNS and CNS Myelin-Forming Cells. *Stem Cells* 38, 470–479.

Zujovic, V., Thibaud, J., Bachelin, C., Vidal, M., Deboux, C., Culpier, F., Stadler, N., Charnay, P., Topilko, P., and Baron-Van Evercooren, A. (2011). Boundary cap cells are peripheral nervous system stem cells that can be redirected into central nervous system lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 10714–10719.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Tracing of *Krox20*- and *Prss56*-expressing BC cells along the nerve roots and in the DRG. (A-F) Transverse sections of *Krox20*^{Cre/+},*R26*^{tdTom} (A-C) and *Prss56*^{Cre/+},*R26*^{tdTom} (D-F) embryos, between E11 and E13.5 as indicated, were analyzed by immunocytochemistry using antibodies against tdTom (red) and β III-tubulin (green). BC-derived cells are present along the nerve roots and within the DRG. Arrows and arrowheads indicate ventral and dorsal BC derivatives, respectively. Labeled cells of CNS origin are also present within the neural tube. (G-I) Sections through the DRG from E18.5 *Prss56*^{Cre/+},*R26*^{tdTom} embryos were analyzed by immunocytochemistry using antibodies against tdTom (red) and neuronal markers (TrkA, TrkB and TrkC, green), as indicated. Inserts show higher magnifications of the corresponding figures. NT, neural tube; DRo, dorsal root; VRo, ventral root; AS, accessory nerve; DRG, dorsal root ganglion. Scale bars: 100 μ m in (A-F) and 50 μ m in (G-I). See also Figure S2.

Figure 2. BC derivatives migrate along the peripheral nerves to the skin. Transverse sections through the trunk of *Prss56*^{Cre/+},*R26*^{tdTom} embryos, between E11.5 and E13.5 as indicated, were analyzed by immunocytochemistry using antibodies against tdTom (red) and β III-tubulin (green). (A) At E11.5, tdTom-positive cells are present along the ventral nerve root (star) and the proximal part of the ventral ramus (VR) (arrows). (B, C) Between E11.75 and E12, traced cells are detected along the VR (arrows) and the extending dorsal ramus (DR) (arrowheads). (D) At E12.5, isolated traced cells are present along the entire trajectory of the nerve (arrowheads). (E-G) From E13, tdTom-positive cells are observed at cutaneous nerves in the dorsal (arrowheads) and ventral (arrows) skin. Dotted lines mark the embryo. NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglia. Scale bars: 100 μ m. See also Figure S3.

Figure 3. Identities of BC-derivatives in the neonatal and adult skin. (a) Whole mount immunostaining of newborn skin from *Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom}* animals for tdTom and β III-tubulin, viewed from the hypodermal side. Most traced cells are in contact with the subcutaneous or dermal nerves (arrows). (B-I) Transverse sections of the skin from *Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom}* newborn animals labeled with the indicated antibodies. In the hypodermis, traced cells are associated with the cutaneous nerves and some express the myelin marker MBP (B, red arrow). In the dermis, tdTom-positive cells are localized along β III-tubulin-positive axons (C) and PGP9.5-positive terminal nerve fibers (D), and express the Schwann cell markers p75^{NGFR} (E) and S100 (F). These Schwann-like cells are associated with dermal nerves (A, C-F, arrows), free nerve endings (C, D, F-I, closed arrowheads) or lanceolate endings of hair follicles (C, D, F, J, empty arrowheads). (G, H) The traced cells associated with free nerve endings are highly ramified and are often in direct contact with blood vessels (arrowheads). (I) Some of the traced cells at lanceolate endings express nestin (empty arrowheads). (J) Electron microscopy analysis of a transverse section through a subcutaneous nerve from adult *Prss56^{Cre/+},R26^{lacZ}* animals. β -galactosidase-positive cells include myelinating (red arrow) and non-myelinating Schwann cells (black arrows), as well as endoneurial fibroblasts (star). (K) Higher magnification of the area outlined in (J). Scale bars: 50 μ m in A-I and 5 μ m in J.

Figure 4. In vitro characterization of skin BC derivatives. (A) Change in the number of tdTom-positive and -negative cells at successive passages (P) in sphere cultures from *Prss56^{Cre/+},R26^{tdTom}* newborn skin. (B) Examples of spheres generated from newborn and adult skin at P2 and P5 showing the content in traced cells (in red). (C) Cell type distribution of tdTom-

positive cells from newborn and adult skin cultured in spontaneous differentiation conditions after the indicated passage. Cultures were performed from the total skin population or p75^{NGFR}- or Thy1-positive subpopulations purified by immuno-panning. Cell types were identified by cell morphology and expression of specific markers (see D-I). Approximate distributions: +: 0.1% to 1%, ++: 1% to 5%, +++: 5% to 15%, ++++: 16% to 40%. (D-I) Cell type identification of tdTom-positive cells from newborn skin cultured in differentiation conditions. Immunolabeling and morphological analysis indicate the presence of neurons (D), myofibroblasts (E-F), adipocytes (G) and Schwann cells (H). In (G), the inset shows a higher magnification allowing the visualization of lipid droplets, characteristic of adipocytes. (I) The proportion of Schwann cells is increased by addition of forskolin and heregulins during differentiation. Arrows point to traced cells expressing the indicated marker (in green). Scale bars: 100 μ m in (B) and 30 μ m in (D-I). See also Figure S4.

Figure 5. Skin BC derivatives give rise to various types of sensory neurons upon transplantation into the DRG. FACS-purified tdTom-positive cells from skin cultures were injected into the DRG of nude mice, which were analyzed by immunohistochemistry 30 days later. (A-J) Transverse sections through the injected DRGs analyzed with antibodies against tdTom and specific markers of neuronal, glial or fibroblastic cell types according to the color code. Arrowheads and arrows indicate neuronal and non-neuronal traced cells, respectively. (K-O) Transverse sections through the spinal nerve attached to the injected DRG. (K) tdTom-positive axons (empty arrowheads) are observed. (L-O) Numerous traced cells encircle β III-tubulin-positive axons. They are negative for immature (M) and myelinating (N) Schwann cell markers, but express NG2 (O), a marker of endo/perineurial fibroblasts. Scale bars: 10 μ m.

Figure 6. Skin BC derivatives give rise to peripheral fibroblasts and Schwann cells upon injection into the injured sciatic nerve. Newborn skin BC derivatives were cultured until P1, FACS-purified (A-C, untreated) or treated with heregulin/forskolin (D-F, +Hrg+Frsk), and injected into injured sciatic nerves. Transverse sections of the grafted sciatic nerves were analyzed six weeks after grafting by immunohistochemistry with antibodies against tdTom and the indicated neuronal, glial and fibroblastic markers according to the color code. Arrowheads point to perineurial cells, closed arrows to endoneurial cells, and open arrows to Schwann cells. Nu: nuclear staining. Ungrafted nerve bundles (stars) do not contain tdTom-positive cells. Scale bars: 50 μ m.

Figure

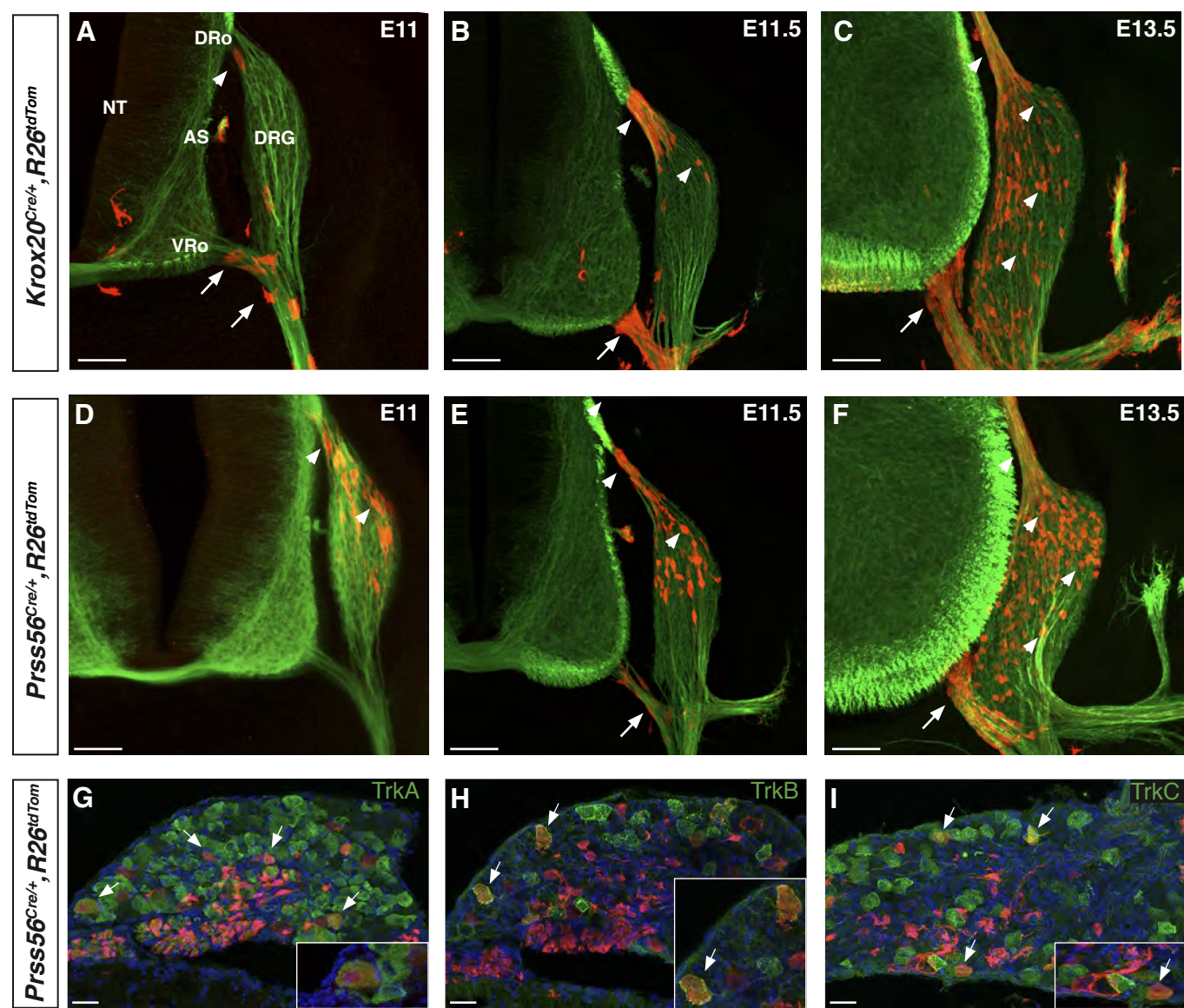


Figure 1

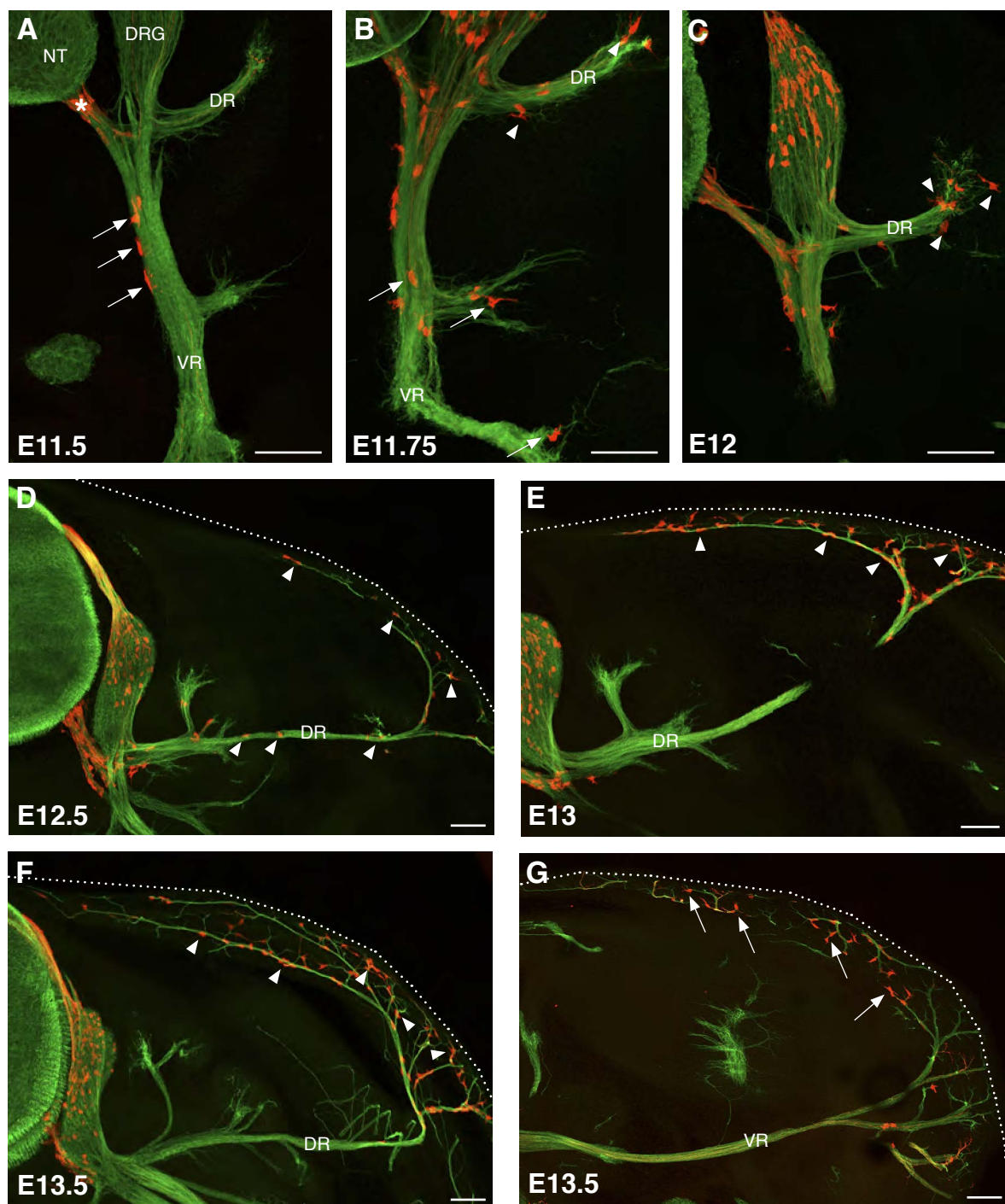


Figure 2

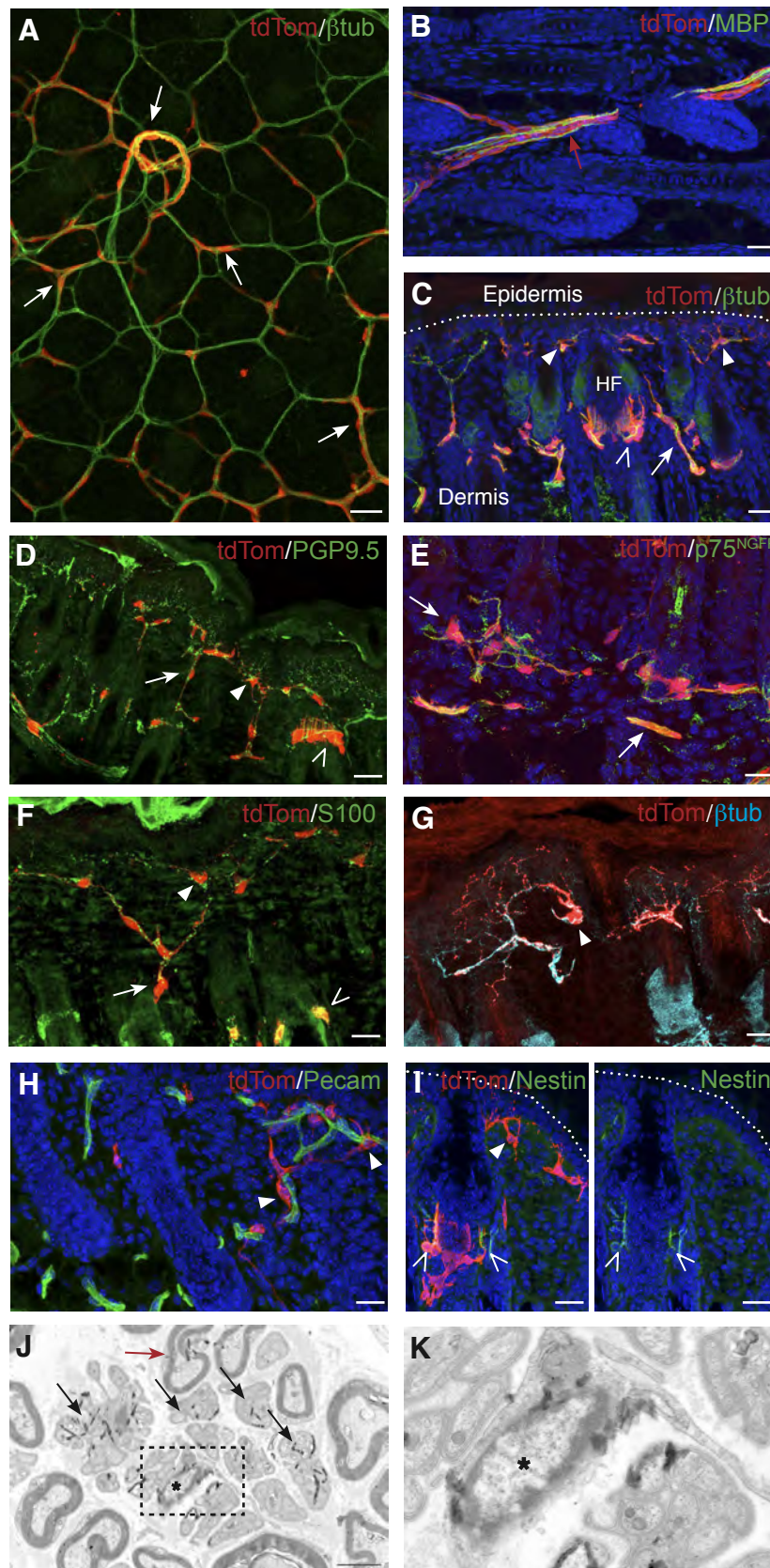


Figure 3

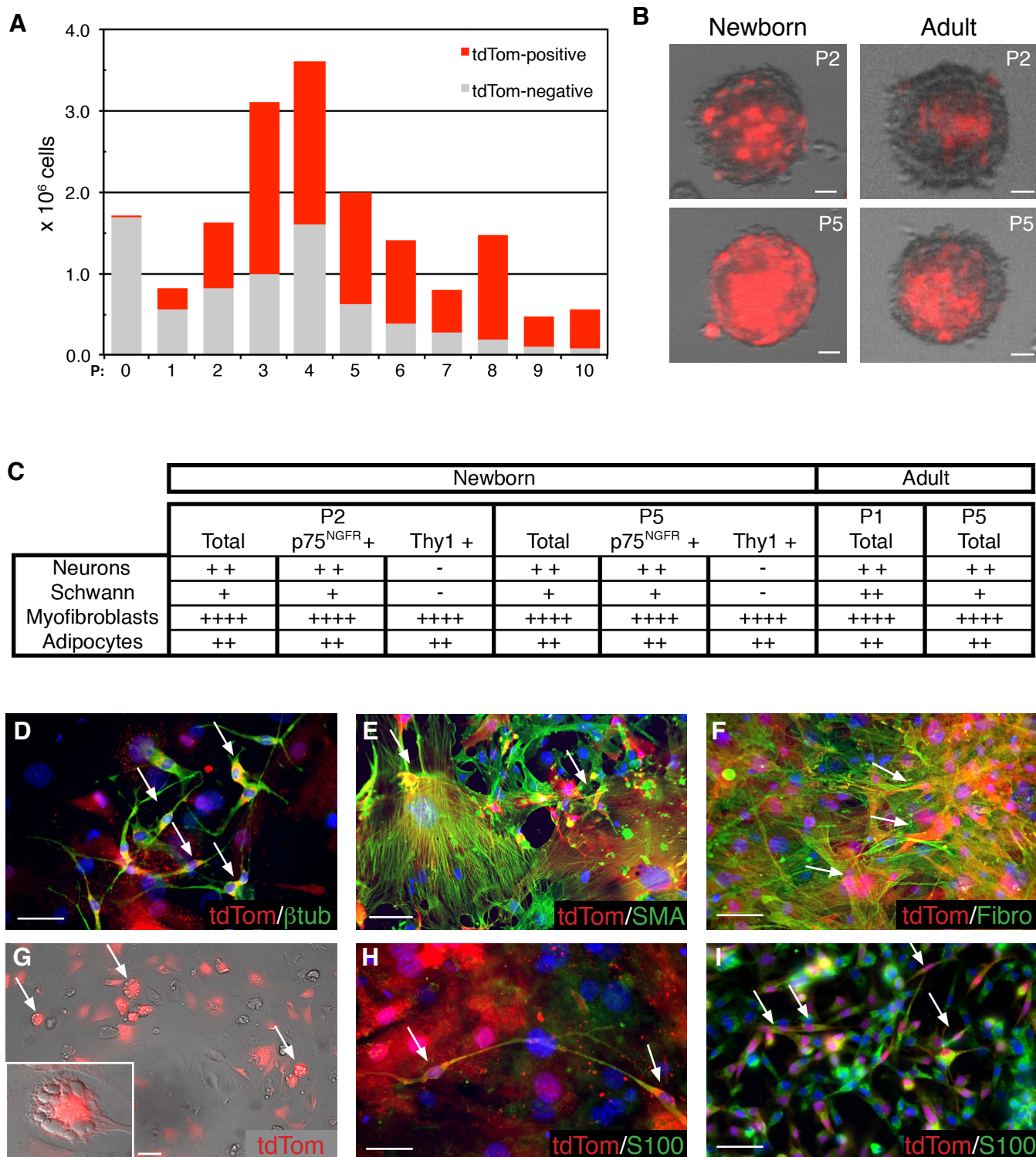


Figure 4

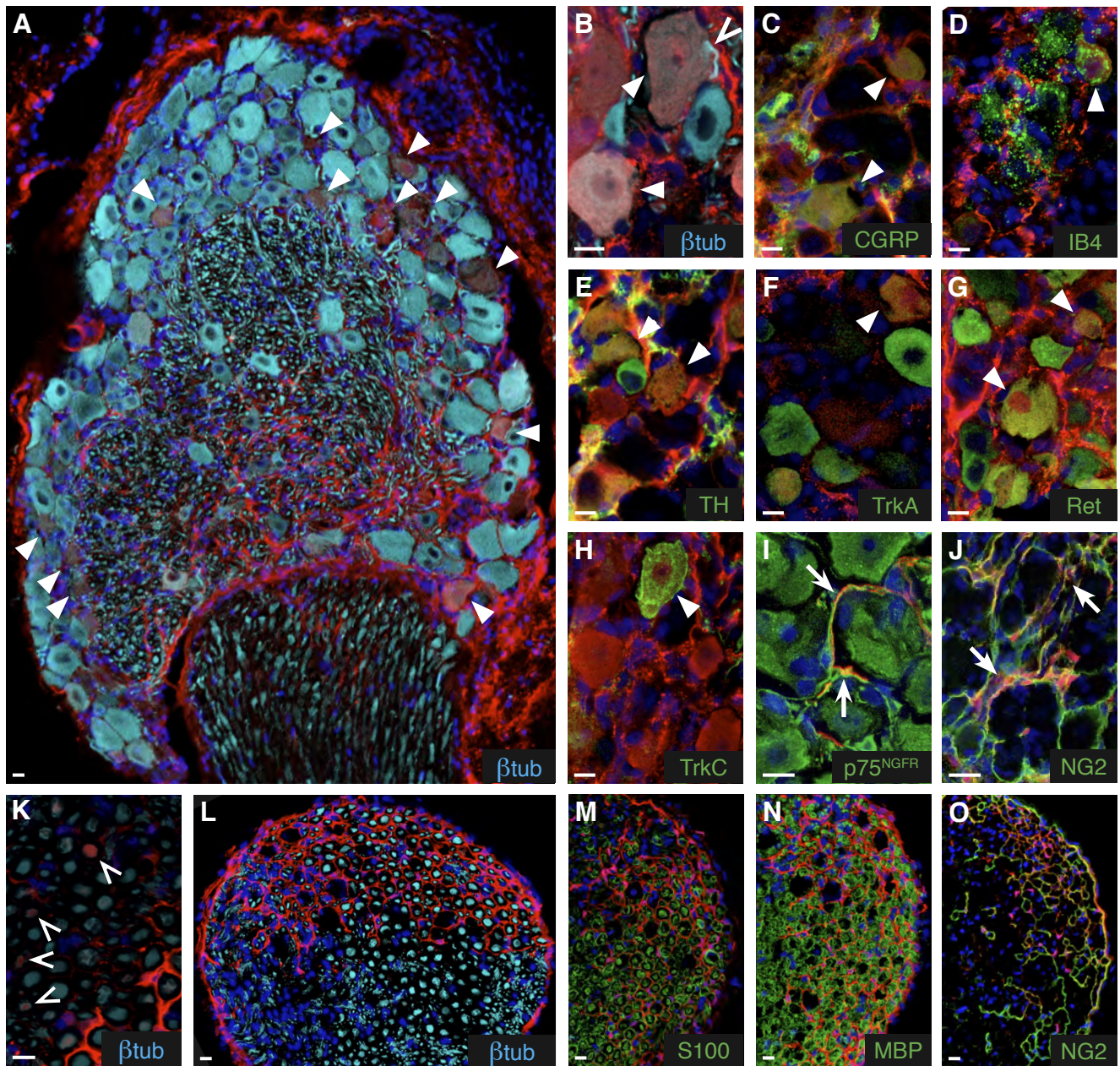


Figure 5

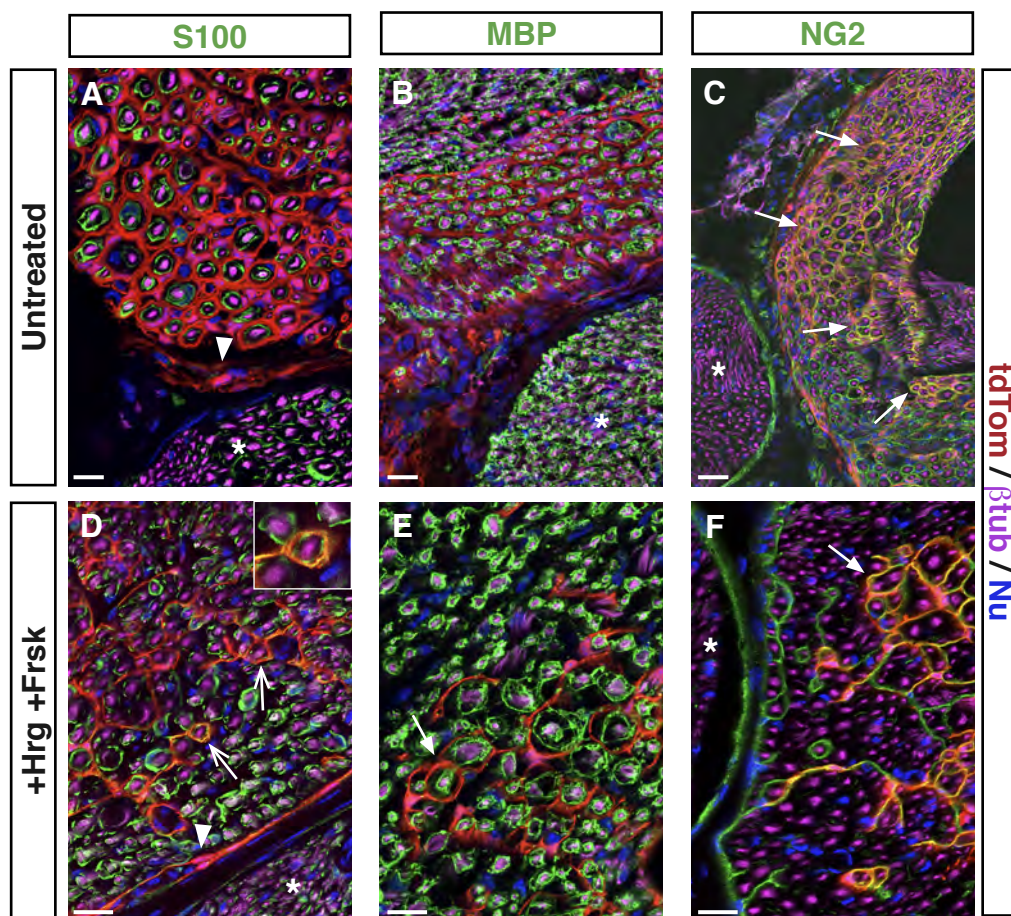


Figure 6

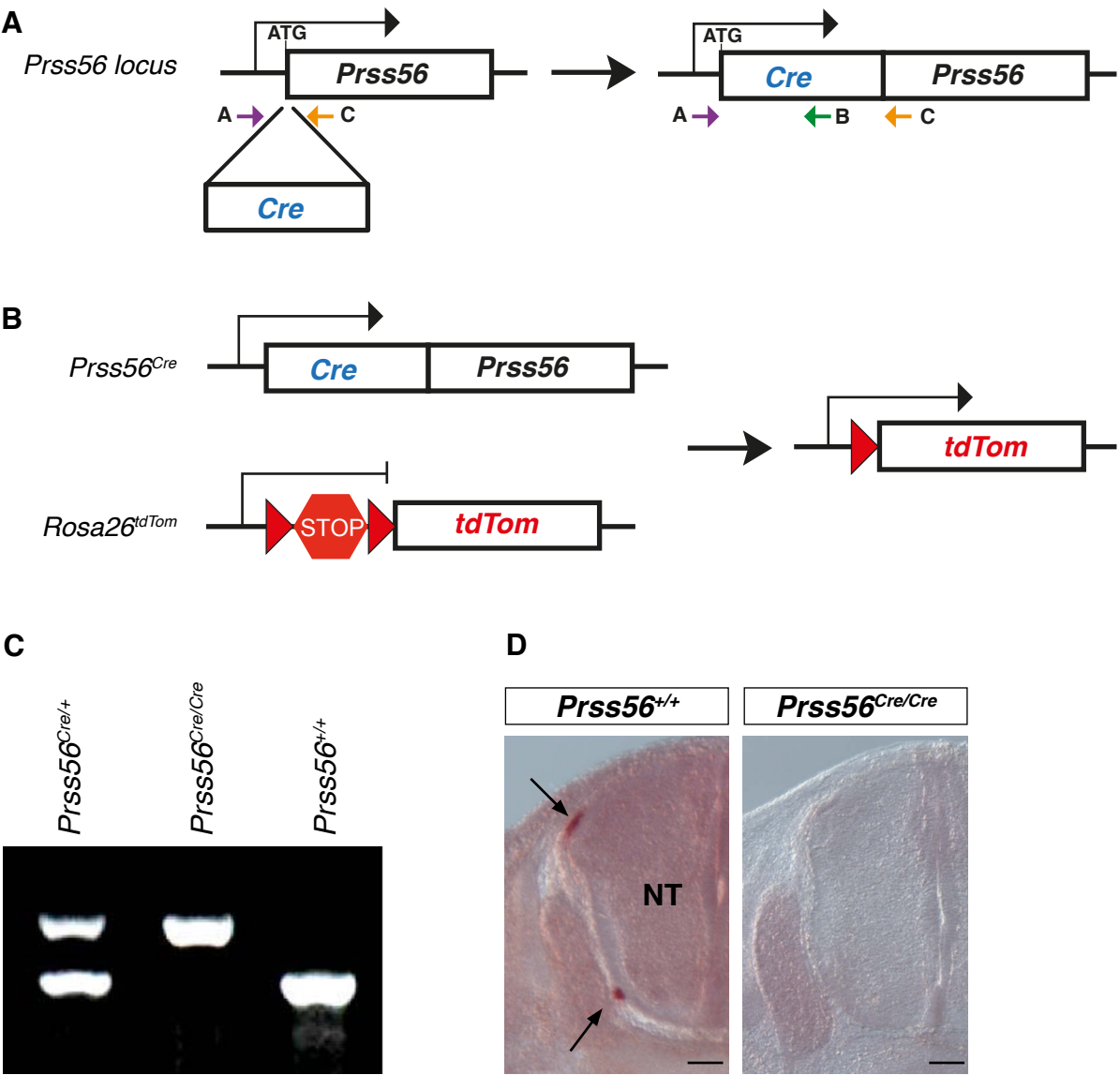


Figure S1

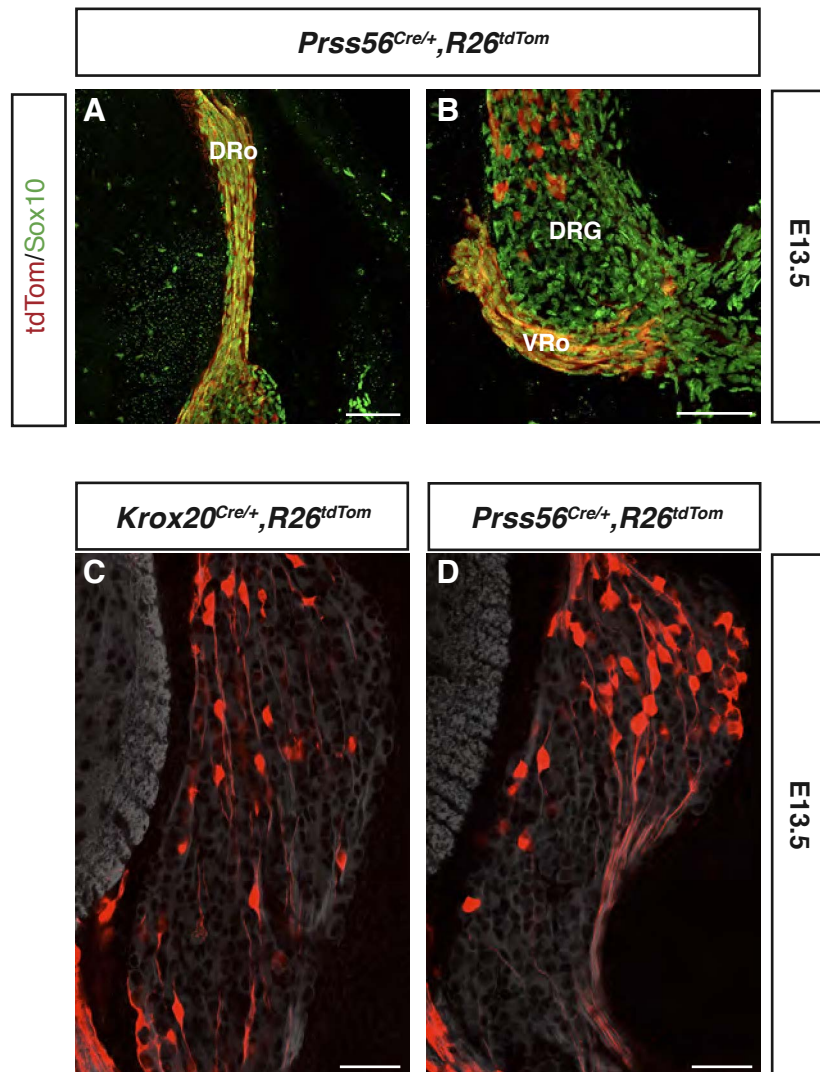


Figure S2

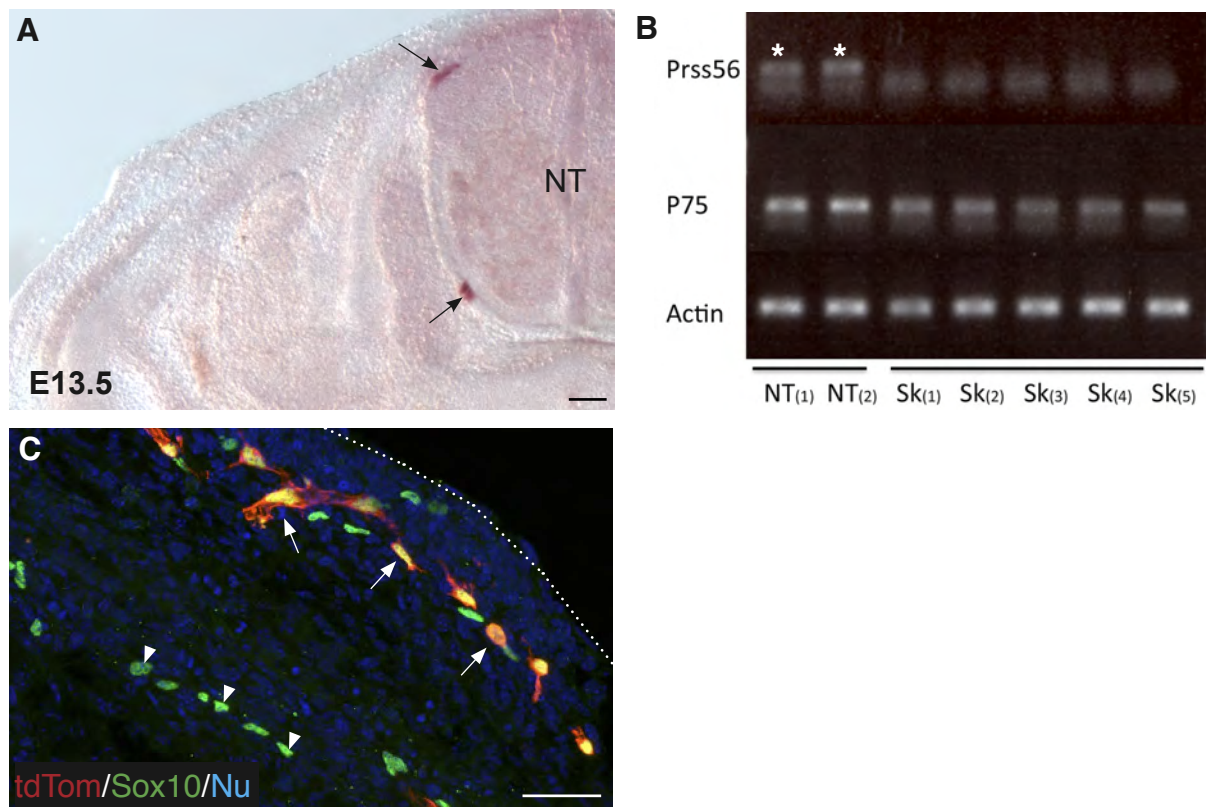


Figure S3

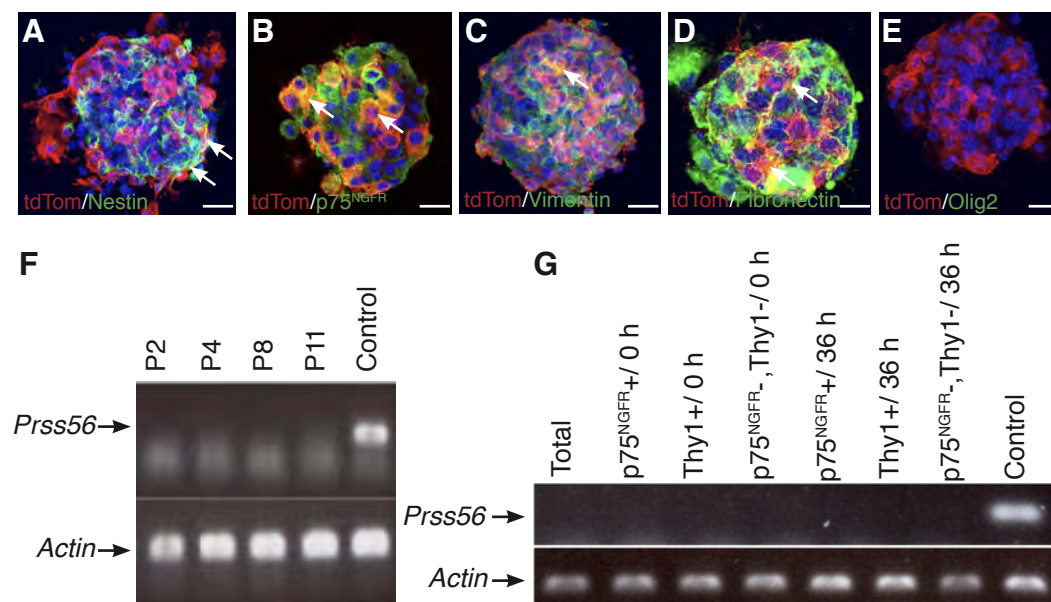


Figure S4

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1, related to Experimental Procedures. Generation of a Cre knock-in at the *Prss56* locus and tracing of the derivatives of *Prss56*-expressing cells. (A) Schematic of the generation of the *Prss56*^{Cre} knock-in allele by insertion of the Cre coding sequence at the *Prss56* initiation codon. The arrows underneath the gene indicate the positions of the primers used for PCR analysis (see panel (C)). (B) Combining the *Prss56*^{Cre/+} allele with the Cre-activable Tomato reporter *Rosa26*^{tdTom} leads to permanent activation of the reporter in *Prss56*-expressing cells and their progeny. (C) Examples of embryo genotyping for the *Prss56* locus, performed by PCR analysis using the combination of primers A, B and C in panel (A). (D) Loss of *Prss56* expression in the BCs of *Prss56*^{Cre/Cre} animals. Transverse sections from E12.5 wild type and *Prss56*^{Cre/Cre} mutant embryos were subjected to in situ hybridization with a *Prss56* probe. The arrows indicate the presence of *Prss56* mRNA in the dorsal and ventral BCs in a wild type embryo. NT, neural tube. Scale bar: 100 μ m . See also Table S1.

Figure S2, related to Figure 1. BC cells give rise to dorsal and ventral root Schwann cells and sensory neurons in the DRG. (A, B) Transverse sections from E13.5 *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} embryos show that most of the cells in the dorsal (A) and ventral (B) roots are positive for both the tracing marker tdTom and the Schwann cell precursor marker Sox10. (C-D) In the DRG from E13.5 *Krox20*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} and *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} embryos, most of the traced cells have a bipolar morphology. DRo, dorsal root; VRo, ventral root. Scale bar 50 μ m.

Figure S3, related to Figure 2. tdTom-positive cells in the skin do not express *Prss56* and are Sox10-positive. (A) In situ hybridization with a *Prss56* probe on a transverse section of a wild type E13.5 embryo. *Prss56* expression is detected in the BCs (arrows), but not in the skin. (B) Analysis of *Prss56* expression by RT-PCR in the skin of wild type E13.5 embryos. SK₍₁₎-SK₍₅₎ correspond to skin preparations from different embryos. NT₍₁₎ and NT₍₂₎ are positive controls corresponding to the neural tubes with attached BC cells from two of these embryos. A *Prss56*-specific band is observed with the neural tube samples (stars), but not with the skin samples. (C) Transverse sections from E13.5 *Prss56*^{Cre/+}, *R26*^{tdTom} embryos analyzed by immunocytochemistry using antibodies against tdTom (red), neuronal (β III-tubulin, blue) and peripheral glia (Sox10, green) markers. tdTom-positive cells are aligned with the nerves and express Sox10 (arrows). NT, neural tube; Nu, Hoechst 33342 labeling of nuclei. Scale bars: 100 μ m in (A) and 50 μ m in (C).

Figure S4, related to Figure 4. Cultured skin cells do not express *Prss56*. (A-E) Characterization of tdTompositive cells (red) from spheres at P2 with glial and stem/progenitors markers (green). Virtually all traced cells express p75^{NGFR} and fibronectin, whereas only subpopulations are positive for nestin and vimentin. The oligodendrocyte progenitor marker Olig2 is not expressed in traced cells. Arrows point to traced cells positive for the indicated marker. Scale bars: 50 μ m. (F) RT-PCR analysis of *Prss56* expression in newborn skin cells maintained in sphere culture conditions for 2, 4, 8 and 11 passages. (G) RT-PCR analysis of *Prss56* expression in total, p75^{NGFR}-positive, Thy1-positive and p75^{NGFR}-, Thy1-double negative skin cell fractions obtained by immuno-panning, freshly isolated (0 h) or maintained in culture for 36 h. *Prss56* expression is not observed in any of the skin-derived cell preparations, whereas it is easily detectable in control samples (Control) of an E13.5 neural tube with attached BC cells.

SUPPLEMENTAL TABLE

mRNA or Gene	Primer sequence	Annealing temp (°C)	Expected product size (bp)
<i>β-actin</i>	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' 5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'	60	165
<i>Prss56</i>	5'-GGTCTTCAGTGGCCTAGTGG-3' 5'-AGCCTCTGTCCTTGATCAGC-3'	58	151
<i>p75^{NGFR}</i>	5'-GTGCGGGGTGGGCTCAGGACT-3' 5'-CCACAAGGCCCAACAACACAGC-3'	62	422
<i>wild type Prss56</i>	A: 5'-CAGGTGAGGTGCGGACCATT-3' C: 5'-AAACCACTGCCCACCGACAT-3'	65	588
<i>Prss56^{Cre}</i>	A: 5'-CAGGTGAGGTGCGGACCATT-3' B: 5'-ACGGAAATCCATCGCTCGACCAGTT-3'		851

Table S1, related to Experimental Procedures. Primer sequences and PCR conditions for RT-PCR and genotyping analyses.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies

For immunofluorescence, the following primary antibodies were used: rabbit anti-tdTom (1:400, Clontech), mouse biotinylated anti-βIII-tubulin (1:800, R&D), rabbit anti-PGP9.5 (1:400; Abcam), goat anti-Sox10 (1:100, Santa Cruz), mouse anti-nestin (1:100; Millipore), rabbit anti-S100 (1:300, Dako), rabbit anti-fibronectin (1:100, Millipore), chicken anti-vimentin (1:100; Millipore), rabbit anti-p75^{NGFR} (1:300; Abcam), mouse anti-SMA (1:400, Sigma), rabbit anti-phospho-Histone H3 (1:100, Millipore), rabbit anti-GFAP (1:300, Dako),

rabbit anti-TrkA (1:500, Millipore), goat anti-TrkB (1:500, R&D), goat anti-TrkC (1:500, R&D), goat anti-Ret (1:20, R&D), mouse anti-CGRP (1:500, Millipore), mouse anti-TH (1:1000, Millipore), rat anti-MBP (1:100, Millipore), IB4-A488 (1:200, Invitrogen) from *Griffonia simplicifolia*, rat anti-PECAM (1:100; BD Pharmingen), and rabbit anti-NG2 (1:200; Millipore). Fluorophore-conjugated secondary antibodies were from Jackson Immuno Research.

Electron microscopy

Subcutaneous nerves from neonatal back skin were dissected and fixed for 2 h in 1% glutaraldehyde, 0.4% PFA in PBS, then washed in PBS and subjected to β -galactosidase staining as previously described (Decker et al., 2006). Nerves were osmified for 1 h in 1% OsO₄ (Polysciences), rinsed in PBS, dehydrated in graded acetone, and embedded in Epon. Semi-thin sections (1 μ m) were stained with toluidine blue. Ultra-thin sections (50 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were observed with a Phillips electron microscope.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA (100 ng) was isolated from embryonic skin, reverse transcribed using the pSuperscript III Rnase H reverse transcriptase (Invitrogen) and a mix of oligo-tdTom random primers (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed as follows: 2 min at 94°C; 30 cycles of 2 min at 94°C, 1 min at the primer-specific annealing temperature, 30 s at 72°C. The primers are shown in Supporting Information Table 1. For each RNA sample, two independent PCR amplifications were performed.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H (2012) Diazepam Binding Inhibitor Promotes Progenitor Proliferation in the Postnatal SVZ by Reducing GABA Signaling. *Stem Cell* 10:76–87.
- Alonso M, Ortega-Perez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM (2008) Turning Astrocytes from the Rostral Migratory Stream into Neurons: A Role for the Olfactory Sensory Organ. *Journal of Neuroscience* 28:11089–11102.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- Alvarez-Bolado G, Paul FA, Blaess S (2012) Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: From progenitor domains to hypothalamic regions. *Neural Dev* 7:4.
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT (2008) The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging Complexity of Their Niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73:357–365.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3–22.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81:728–739.
- Azim K, Fischer B, Hurtado-Chong A, Draganova K, Cantù C, Zemke M, Sommer L, Butt A, Raineteau O (2014) Persistent Wnt/ β -Catenin Signaling Determines Dorsalization of the Postnatal Subventricular Zone and Neural Stem Cell Specification into Oligodendrocytes and Glutamatergic Neurons. *STEM CELLS* 32:1301–1312.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575–579.
- Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prevot V (2014) Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell Metabolism* 19:293–301.
- Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM (2011) From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 34:963–977.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, Liu KJ, Baker CVH (2010) Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21040–21045.
- Barry G, Piper M, Lindwall C, Moldrich R, Mason S, Little E, Sarkar A, Tole S, Gronostajski RM, Richards LJ (2008) Specific glial populations regulate hippocampal morphogenesis. *J Neurosci* 28:12328–12340.
- Batailler M, Droguerre M, Baroncini M, Fontaine C, Prevot V, Migaud M (2014) DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: A comparative study between mouse, sheep, and human tissues. *J Comp Neurol* 522:1966–1985.

- Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G (2008) The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes. *Journal of Neuroscience* 28:3966–3975.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2014) Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J, Bayam E, Lepier A, Stempfhuber B, Kirchhoff F, Hirrlinger J, Haslinger A, Lie DC, Beckers J, Yoder B, Irmeler M, Götz M (2010) In Vivo Fate Mapping and Expression Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Prospectively Isolated Adult Neural Stem Cells. *Stem Cell* 7:744–758.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MSY, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landén M, Druid H, Spalding KL, Frisén J (2012) The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron* 74:634–639.
- Blackshaw S, Scholpp S, Placzek M, Ingraham H, Simerly R, Shimogori T (2010) Molecular Pathways Controlling Development of Thalamus and Hypothalamus: From Neural Specification to Circuit Formation. *Journal of Neuroscience* 30:14925–14930.
- Bolborea M, Dale N (2013) Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in Neurosciences*:1–10.
- Bonaguidi MA, Song J, Ming G-L, Song H (2012) A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*:1–8.
- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming G-L, Song H (2011) In Vivo Clonal Analysis Reveals Self-Renewing and Multipotent Adult Neural Stem Cell Characteristics. *Cell* 145:1142–1155.
- Bonfanti L (2013) The (Real) Neurogenic/Gliogenic Potential of the Postnatal and Adult Brain Parenchyma. *ISRN Neuroscience* 2013:1–14.
- Booker-Dwyer T, Hirsh S, Zhao H (2008) A unique cell population in the mouse olfactory bulb displays nuclear β -catenin signaling during development and olfactory sensory neuron regeneration. *Devel Neurobio* 68:859–869.
- Bowman AN, van Amerongen R, Palmer TD, Nusse R (2013) Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/ β -catenin-responsive neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:7324–7329.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascón S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524–1533.
- Brunne B, Franco S, Bouché E, Herz J, Howell BW, Pahle J, Müller U, May P, Frotscher M, Bock HH (2013) Role of the postnatal radial glial scaffold for the development of the dentate gyrus as revealed by reelin signaling mutant mice. *Glia* 61:1347–1363.
- Brunne B, Zhao S, Derouiche A, Herz J, May P, Frotscher M, Bock HH (2010) Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia*:n/a–n/a.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *Journal of Neuroscience* 28:264–278.

- Cameron HA, Glover LR (2013) Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. *Annu Rev Psychol* 66:140924164224001.
- Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A (2013) The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Front Cell Neurosci* 7.
- Castrén E, Hen R (2013) Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends in Neurosciences* 36:259–267.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, DeLeo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014) Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82:545–559.
- Conover JC, Shook BA (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging Dis* 2:49–63.
- Coulpier F, Le Crom S, Maro GS, Manent J, Giovannini M, Maciorowski Z, Fischer A, Gessler M, Charnay P, Topilko P (2009) Novel features of boundary cap cells revealed by the analysis of newly identified molecular markers. *Glia* 57:1450–1457.
- Dayer AG (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of Cell Biology* 168:415–427.
- de Chevigny A, Core N, Follert P, Gaudin M, Barbry P, Beclin C, Cremer H (2012) miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 15:1120–1126.
- De Marchis S, Bovetti S, Carletti B, Hsieh YC, Garzotto D, PERETTO P, Fasolo A, Puche AC, Rossi F (2007) Generation of Distinct Types of Periglomerular Olfactory Bulb Interneurons during Development and in Adult Mice: Implication for Intrinsic Properties of the Subventricular Zone Progenitor Population. *Journal of Neuroscience* 27:657–664.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience* 11:339–350.
- Dhaliwal J, Lagace DC (2011) Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *European Journal of Neuroscience* 33:1025–1036.
- Díaz-Guerra E, Pignatelli J, Nieto-Estévez V, Vicario-Abejón C (2013) Transcriptional regulation of olfactory bulb neurogenesis. *Anat Rec (Hoboken)* 296:1364–1382.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11619–11624.
- Drew LJ, Fusi S, Hen R (2013) Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the dentate gyrus? *Learning & Memory* 20:710–729.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2014) Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156:1072–1083.

- Ernst A, Frisén J (2015) Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLoS Biol* 13:e1002045.
- Esposito MS (2005) Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *Journal of Neuroscience* 25:10074–10086.
- Faigle R, Song H (2013) Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1830:2435–2448.
- Favaro R, Valotta M, Ferri ALM, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK (2009) Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* 12:1248–1256.
- Gammill LS, Bronner-Fraser M (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews Neuroscience* 4:795–805.
- Ge S, Yang C-H, Hsu K-S, Ming G-L, Song H (2007) A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron* 54:559–566.
- Giachino C, Basak O, Lugert S, Knuckles P, Obernier K, Fiorelli R, Frank S, Raineteau O, Álvarez-Buylla A, Taylor V (2013) Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population. *STEM CELLS*:n/a–n/a.
- Gould E (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience* 8:481–488.
- Guo C, Eckler MJ, McKenna WL, McKinsey GL, Rubenstein JLR, Bin Chen (2013) Fezf2 Expression Identifies a Multipotent Progenitor for Neocortical Projection Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes. *Neuron* 80:1167–1174.
- Guo F, Maeda Y, Ma J, Xu J, Horiuchi M, Miers L, Vaccarino F, Pleasure D (2010) Pyramidal Neurons Are Generated from Oligodendroglial Progenitor Cells in Adult Piriform Cortex. *Journal of Neuroscience* 30:12036–12049.
- Haan N, Goodman T, Najdi-Samiei A, Stratford CM, Rice R, Agha El E, Bellusci S, Hajihosseini MK (2013) Fgf10-Expressing Tanycytes Add New Neurons to the Appetite/Energy-Balance Regulating Centers of the Postnatal and Adult Hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 33:6170–6180.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR (2010) nature08845. *Nature* 464:554–561.
- He W, Ingraham C, Rising L, Goderie S, Temple S (2001) Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *Journal of Neuroscience* 21:8854–8862.
- Hodge RD, Garcia AJ, Elsen GE, Nelson BR, Mussar KE, Reiner SL, Ramirez JM, Hevner RF (2013) Tbr2 Expression in Cajal-Retzius Cells and Intermediate Neuronal Progenitors Is Required for Morphogenesis of the Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience* 33:4165–4180.
- Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, Hevner RF (2012) Tbr2 Is Essential for Hippocampal Lineage Progression from Neural Stem Cells to Intermediate Progenitors and Neurons. *Journal of Neuroscience* 32:6275–6287.
- Ihrle RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, Kriegstein AR, Álvarez-Buylla A (2011) Persistent Sonic Hedgehog Signaling in Adult Brain Determines Neural Stem Cell Positional Identity. *Neuron* 71:250–262.

- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
- Iwano T, Masuda A, Kiyonari H, Enomoto H, Matsuzaki F (2012) Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development* 139:3051–3062.
- Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, Chen JW, Lee RT, Wagers AJ, Rubin LL (2014) Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science* 344:630–634.
- Kelsch W, Mosley CP, Lin C-W, Lois C (2007) Distinct Mammalian Precursors Are Committed to Generate Neurons with Defined Dendritic Projection Patterns. *PLoS Biol* 5:e300.
- Kim JG et al. (2014) Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci* 17:908–910.
- Kohwi M (2005) Pax6 Is Required for Making Specific Subpopulations of Granule and Periglomerular Neurons in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 25:6997–7003.
- Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, Rubenstein JLR, Alvarez-Buylla A (2007) A Subpopulation of Olfactory Bulb GABAergic Interneurons Is Derived from Emx1- and Dlx5/6-Expressing Progenitors. *Journal of Neuroscience* 27:6878–6891.
- Kokoeva MV (2005) Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Mice: Potential Role in Energy Balance. *Science* 310:679–683.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2007) Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol* 505:209–220.
- Langlet F (2014) Tanycytes: A Gateway to the Metabolic Hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 26:753–760.
- Lazarini FO, Lledo P-M (2011) Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in Neurosciences* 34:20–30.
- Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15:700–702.
- Lee DA, Yoo S, Pak T, Salvatierra J, Velarde E, Aja S, Blackshaw S (2014) Dietary and sex-specific factors regulate hypothalamic neurogenesis in young adult mice. *Front Neurosci* 8:157.
- Lemasson M (2005) Neonatal and Adult Neurogenesis Provide Two Distinct Populations of Newborn Neurons to the Mouse Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 25:6816–6825.
- Li G, Fang L, Fernández G, Pleasure SJ (2013) The Ventral Hippocampus Is the Embryonic Origin for Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus. *Neuron*:1–15.
- Li G, Kataoka H, Coughlin SR, Pleasure SJ (2009) Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development* 136:327–335.
- Li J, Tang Y, Cai D (2012) IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nature Cell Biology* 14:999–

- Li X, Sun C, Lin C, Ma T, Madhavan MC, Campbell K, Yang Z (2011) The Transcription Factor Sp8 Is Required for the Production of Parvalbumin-Expressing Interneurons in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 31:8450–8455.
- Lim DA, Álvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences* 37:563–571.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179–1187.
- Livneh Y, Adam Y, Mizrahi A (2014) Odor Processing by Adult-Born Neurons. *Neuron* 81:1097–1110.
- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 7:179–193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145–1148.
- Lopez-Juarez A, Howard J, Ullom K, Howard L, Grande A, Pardo A, Waclaw R, Sun YY, Yang D, Kuan CY, Campbell K, Nakafuku M (2013) Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes & Development* 27:1272–1287.
- Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC (2008) Subventricular Zone-Mediated Ependyma Repair in the Adult Mammalian Brain. *Journal of Neuroscience* 28:3804–3813.
- Magavi S, Friedmann D, Banks G, Stolfi A, Lois C (2012) Coincident Generation of Pyramidal Neurons and Protoplasmic Astrocytes in Neocortical Columns. *Journal of Neuroscience* 32:4762–4772.
- Magnusson JP, Goritz C, Tatarishvili J, Dias DO, Smith EMK, Lindvall O, Kokaia Z, Frisen J (2014) A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* 346:237–241.
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* 10:1003–1011.
- Malatesta P, Götz M (2013) Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* 140:483–486.
- Mangale VS, Hirokawa KE, Satyaki PRV, Gokulchandran N, Chikbire S, Subramanian L, Shetty AS, Martynoga B, Paul J, Mai MV, Li Y, Flanagan LA, Tole S, Monuki ES (2008) Lhx2 Selector Activity Specifies Cortical Identity and Suppresses Hippocampal Organizer Fate. *Science* 319:304–309.
- Markakis EA (2002) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 23:257–291.
- Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P (2004) Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci* 7:930–938.

- Martynoga B, Mateo JL, Zhou B, Andersen J, Achimastou A, Urban N, van den Berg D, Georgopoulou D, Hadjur S, Wittbrodt J, Ettwiller L, Piper M, Gronostajski RM, Guillemot F (2013) Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes & Development* 27:1769–1786.
- Menn B, Garcia-Verdugo J-M, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *Journal of Neuroscience* 26:7907–7918.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sanders TA, Magno L, Kessaris N, Álvarez-Buylla A (2013) Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci*.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic Organization of Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Science* 317:381–384.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo J-M, Álvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17528–17532.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *European Journal of Neuroscience* 32:2042–2052.
- Ming G-L, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo J-M, Álvarez-Buylla A (2008) Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3:265–278.
- Mohr MA, Sisk CL (2013) Pubertally born neurons and glia are functionally integrated into limbic and hypothalamic circuits of the male Syrian hamster. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4792–4797.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008) Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132:598–611.
- Nair KS, Hmani-Aifa M, Ali Z, Kearney AL, Salem SB, Macalinao DG, Cosma IM, Bouassida W, Hakim B, Benzina Z, Soto I, Söderkvist P, Howell GR, Smith RS, Ayadi H, John SWM (2011) Alteration of the serine protease PRSS56 causes angle-closure glaucoma in mice and posterior microphthalmia in humans and mice. *Nat Genet* 43:579–584.
- Niwa A, Nishibori M, Hamasaki S, Kobori T, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Takahashi H (2015) Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. *Brain Struct Funct*.
- Ortega F, Gascón S, Masserdotti G, Deshpande A, Simon C, Fischer J, Dimou L, Chichung Lie D, Schroeder T, Berninger B (2013) Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature Cell Biology* 15:602–613.
- Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT (2014) Identification of distinct ChAT+ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci* 17:934–942.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 21:6706–6717.

- Pérez-Martín M, Cifuentes M, Grondona JM, López-Ávalos MD, Gómez-Pinedo U, García-Verdugo JM, Fernández-Llebrez P (2010) IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci* 31:1533–1548.
- Pierce AA, Xu AW (2010) De Novo Neurogenesis in Adult Hypothalamus as a Compensatory Mechanism to Regulate Energy Balance. *Journal of Neuroscience* 30:723–730.
- Platel J-C, Stambouliau S, Nguyen I, Bordey A (2010) Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Research Reviews* 63:60–71.
- Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Álvarez-Buylla A (2013) Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E1045–E1054.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710.
- Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I (2011) NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron* 70:661–673.
- Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, Ninkovic J, Briancon N, Maratos-Flier E, Flier JS, Kokoeva MV, Placzek M (2013a) α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* 4:2049.
- Robins SC, Trudel E, Rotondi O, Liu X, Djogo T, Kryzskaya D, Bourque CW, Kokoeva MV (2013b) Evidence for NG2-glia Derived, Adult-Born Functional Neurons in the Hypothalamus Migaud M, ed. *PLoS ONE* 8:e78236.
- Rodríguez EM, Blázquez JL, Pastor FE, Peláez B, Peña P, Peruzzo B, Amat P (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89–164.
- Rojczyk-Golebiewska E, Pałasz A, Wiaderkiewicz R (2014) Hypothalamic Subependymal Niche: A Novel Site of the Adult Neurogenesis. *Cell Mol Neurobiol* 34:631–642.
- Rolando C, Taylor V (2014) Neural stem cell of the hippocampus: development, physiology regulation, and dysfunction in disease. *Curr Top Dev Biol* 107:183–206.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214–222.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai H-H, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo J-M, Rowitch DH, Álvarez-Buylla A (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382–386.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Álvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740–744.
- Saper CB (2006) Staying awake for dinner: hypothalamic integration of sleep, feeding, and circadian rhythms. In: *Progress in Brain Research*, pp 243–252 Progress in Brain Research. Elsevier.
- Sawada M, Matsumoto M, Sawamoto K (2014) Vascular regulation of adult neurogenesis under physiological and pathological conditions. *Front Neurosci* 8:53.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS,

- Garcia-Verdugo J-M, Marin O, Rubenstein JLR, Tessier-Lavigne M, Okano H, Álvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629–632.
- Scadden DT (2014) Nice Neighborhood: Emerging Concepts of the Stem Cell Niche. *Cell* 157:41–50.
- Severi I, Perugini J, Mondini E, Smorlesi A, Frontini A, Cinti S, Giordano A (2013) Opposite effects of a high-fat diet and calorie restriction on ciliary neurotrophic factor signaling in the mouse hypothalamus. *Front Neurosci* 7:263.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338–1340.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang S-M, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ Stem Cells Lie in a Vascular Niche: A Quantitative Analysis of Niche Cell-Cell Interactions. *Cell Stem Cell* 3:289–300.
- Shilo B-Z, Haskel-Ittah M, Ben-Zvi D, Schejter ED, Barkai N (2013) Creating gradients by morphogen shuttling. *Trends in Genetics* 29:339–347.
- Shook BA, Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012) Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *Journal of Neuroscience* 32:6947–6956.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Stem Cell* 7:483–495.
- Sirko S et al. (2013) Reactive Glia in the Injured Brain Acquire Stem Cell Properties in Response to Sonic Hedgehog Glia. *Stem Cell* 12:426–439.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*:1–5.
- Sousa-Ferreira L, de Almeida LP, Cavadas C (2014) Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25:80–88.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J (2013) Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153:1219–1227.
- Stenman J, Toresson H, Campbell K (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 23:167–174.
- Stoll EA, Habibi BA, Mikheev AM, Lasiene J, Massey SC, Swanson KR, Rostomily RC, Horner PJ (2011) Increased Re-Entry into Cell Cycle Mitigates Age-Related Neurogenic Decline in the Murine Subventricular Zone. *STEM CELLS* 29:2005–2017.
- Su Z, He C (2010) Olfactory ensheathing cells: Biology in neural development and regeneration. *Progress in Neurobiology* 92:517–532.
- Subramanian L, Remedios R, Shetty A, Tole S (2009) Signals from the edges: The cortical hem and antihem in telencephalic development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:712–718.
- Subramanian L, Sarkar A, Shetty AS, Muralidharan B, Padmanabhan H, Piper M, Monuki ES, Bach I,

- Gronostajski RM, Richards LJ, Tole S (2011) Transcription factor Lhx2 is necessary and sufficient to suppress astrogliogenesis and promote neurogenesis in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E265–E274.
- Sugiyama T, Osumi N, Katsuyama Y (2013) The germinal matrices in the developing dentate gyrus are composed of neuronal progenitors at distinct differentiation stages. *Dev Dyn* 242:1442–1453.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2⁺ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515–528.
- Tabakow P, Raisman G, Fortuna W, Czyz M, Huber J, Li D, Szewczyk P, Okurowski S, Miedzybrodzki R, Czapiga B, Salomon B, Halon A, Li Y, Lipiec J, Kulczyk A, Jarmundowicz W (2014) Functional Regeneration of Supraspinal Connections in a Patient With Transected Spinal Cord Following Transplantation of Bulbar Olfactory Ensheathing Cells With Peripheral Nerve Bridging. *cell transplant* 23:1631–1655.
- Tang Y, Purkayastha S, Cai D (2015) Hypothalamic microinflammation: a common basis of metabolic syndrome and aging. *Trends in Neurosciences* 38:36–44.
- Tong CK, Chen J, Cebrian-Silla A, Mirzadeh Z, Obernier K, Guinto CD, Tecott LH, Garcia-Verdugo J-M, Kriegstein A, Álvarez-Buylla A (2014a) Axonal Control of the Adult Neural Stem Cell Niche. *Stem Cell*:1–12.
- Tong CK, Han YG, Shah JK, Obernier K, Guinto CD, Alvarez-Buylla A (2014b) Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:12438–12443.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371:796–799.
- Tramontin AD, Garcia-Verdugo J-M, Lim DA, Álvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580–587.
- Urbán N, Guillemot F (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8:396.
- Ventura RE, Goldman JE (2007) Dorsal Radial Glia Generate Olfactory Bulb Interneurons in the Postnatal Murine Brain. *Journal of Neuroscience* 27:4297–4302.
- Vermeren M, Maro GS, Bron R, McGonnell IM, Charnay P, Topilko P, Cohen J (2003) Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron* 37:403–415.
- Vincent AJ, West AK, Chuah MI (2005) Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol* 34:65–80.
- Wang C, You Y, Qi D, Zhou X, Wang L, Wei S, Zhang Z, Huang W, Liu Z, Liu F, Ma L, Yang Z (2014) Human and Monkey Striatal Interneurons Are Derived from the Medial Ganglionic Eminence But Not from the Adult Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience* 34:10906–10923.
- Wang X, Kopinke D, Lin J, McPherson AD, Duncan RN, Otsuna H, Moro E, Hoshijima K, Grunwald DJ, Argenton F, Chien C-B, Murtaugh LC, Dorsky RI (2012) Wnt Signaling Regulates

Postembryonic Hypothalamic Progenitor Differentiation. *Developmental Cell* 23:624–636.

Wang X, Tsai J-W, LaMonica B, Kriegstein AR (2011) nn.2807. *Nat Neurosci* 14:555–561.

Wang Y-Z, Molotkov A, Song L, Li Y, Pleasure DE, Zhou C-J (2008) Activation of the Wnt/ β -catenin signaling reporter in developing mouse olfactory nerve layer marks a specialized subgroup of olfactory ensheathing cells. *Dev Dyn* 237:3157–3168.

Wei B, Nie Y, Li X, Wang C, Ma T, Huang Z, Tian M, Sun C, Cai Y, You Y, Liu F, Yang Z (2011) Emx1-expressing neural stem cells in the subventricular zone give rise to new interneurons in the ischemic injured striatum. *European Journal of Neuroscience* 33:819–830.

Xu L, Tang X, Wang Y, Xu H, Fan X (2014) Radial Glia, the Keystone of the Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *Mol Neurobiol*.

Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental Neurology* 192:251–264.

Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD (2007) Subventricular Zone Stem Cells Are Heterogeneous with Respect to Their Embryonic Origins and Neurogenic Fates in the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* 27:8286–8296.

Young SZ, Taylor MM, Bordey A (2011) Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 33:1123–1132.

Yu DX, Marchetto MC, Gage FH (2014) How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. *Development* 141:2366–2375.

Zaghetto AA, Paina S, Mantero S, Platonova N, PERETTO P, Bovetti S, Puche A, Piccolo S, Merlo GR (2007) Activation of the Wnt Catenin Pathway in a Cell Population on the Surface of the Forebrain Is Essential for the Establishment of Olfactory Axon Connections. *Journal of Neuroscience* 27:9757–9768.

Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D (2013) Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature* 497:211–216.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132:645–660.